

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**AUTENTICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES
DE ESPECIES DE CAZA MAYOR POR TÉCNICAS
GENÉTICAS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Violeta Fajardo Martín

Bajo la dirección de las doctoras

María Isabel González Alonso
Teresa García Lacarra
María del Rosario Martín de Santos

Madrid, 2009

- ISBN:978-84-692-6751-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**AUTENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE
ESPECIES DE CAZA MAYOR POR TÉCNICAS
GENÉTICAS**

TESIS DOCTORAL

VIOLETA FAJARDO MARTÍN
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**AUTENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE
ESPECIES DE CAZA MAYOR POR TÉCNICAS
GENÉTICAS**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada
Violeta Fajardo Martín

Madrid, enero de 2009



DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 37 50. Fax: 91 394 37 43

M^a ISABEL CONZÁLEZ ALONSO (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*), TERESA GARCÍA LACARRA (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*) y M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (*Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*).

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Autenticación de carnes procedentes de especies de caza mayor por técnicas genéticas”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Violeta Fajardo Martín, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 8 de enero de 2009

Fdo: M^a Isabel González Alonso

Fdo: Teresa García Lacarra

Fdo: M^a Rosario Martín de Santos

A mis padres Emilio y Rosi

A mis abuelos Asunción, Bernarda y Severino

A Javi

*En memoria de mi tío Jesús y mi
compañero Luis*

AGRADECIMIENTOS

Para mí, este es un apartado primordial y como tal, necesita estar en primer y destacado lugar. Sin embargo, debo resaltar que ha sido uno de los capítulos que más trabajo me ha costado escribir ya que será la parte más leída y, además, porque temo olvidarme de alguien, lo cual lamentaré enormemente.

Pienso que realmente uno no valora ni comprende la importancia de expresar agradecimientos al terminar un trabajo escrito hasta que se ha atravesado el trance de desarrollar una tesis doctoral. Por ello, quisiera aprovechar estas líneas para expresar la gratitud que siento hacia todas las personas que me han ayudado, apoyado y soportado durante esta etapa de mi vida. Puesto que la felicidad y el alivio por el trabajo terminado pueden ser pasajeros, me gustaría aclarar que la deuda que tengo con las personas que aquí nombro rebasa sobradamente su relación con esta tesis doctoral.

A mis directoras de tesis, Isabel González Alonso, Rosario Martín de Santos y Teresa García Lacarra. Isabel, muchas gracias por dedicar una parte de tu vida a compartir tu tiempo y conocimientos conmigo, a ayudarme y corregir con una paciencia infinita todas y cada una de estas páginas. Valoro mucho que nunca te hayas enfadado o alterado por mis equivocaciones y siempre me hayas indicado el mejor camino. Charo, gracias por el apoyo y confianza mostrados desde el primer momento. Tu tenacidad, empeño y dedicación me han permitido finalizar con éxito este proyecto. Teresa, te muestro mi gratitud más sincera por todas las dudas y preguntas aclaradas con tanta entrega y generosidad, incluso a horas inoportunas. Indudablemente, os doy las gracias a todas por vuestro aguante a la hora de escuchar mis preocupaciones y vacilaciones, a veces con tanta insistencia que molestaba, perdonadme.

A todas las personas que de forma desinteresada han recogido e identificado las muestras necesarias para llevar a cabo este trabajo de investigación, siendo una parte esencial del mismo. Entre ellas, al Dr. Santiago Lavín González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), Dña. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) y a D. Jordi Romeva Manade (Servicios Veterinarios, Tarragona).

A D. Vicente González Aranguren, profesor del Dpto. de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, por la amabilidad y atención mostradas.

A la Comunidad Autónoma de Madrid por la concesión del Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 y al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca recibida dentro del Plan de Formación de Profesorado Universitario y la asignación del Proyecto

AGL2004-00121. A Lorenzo de la Hoz Perales, Director del Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid cuando empecé mi tesis doctoral, por darme la oportunidad de realizarla en este Departamento; y la nueva Directora, M^a Dolores Selgas Cortecero, por su ayuda en la tramitación de esta tesis.

Al Dpto. de Bioquímica de los laboratorios Campden and Chorleywood Food Research Association (CCFRA) en Inglaterra por brindarme el privilegio de disfrutar una maravillosa estancia en su centro. En especial a John Dooley, Steve Garret y Helen Brown por su saber hacer y tratarme como a una más del grupo. También, a Clara y Sara, la colonia española en Stratford, os agradezco todo vuestro apoyo y compañía. Además, quisiera dar las gracias a Marie-Anne, Helen A., Piotr, Haz y Kirsty por sus enseñanzas y animadas conversaciones.

Asimismo, también quiero mostrar mi agradecimiento a los profesores y personal de nuestro Departamento por ayudarme a solventar complicaciones o escuchar y charlar sobre mis problemas. En particular a María Marín, Juan Miguel Rodríguez, Ana Haza, Pablo E. Hernández, Aurora, Alberto, Santiago y Rosi.

Ellos lo saben, pero no puedo dejar de repetírselo una vez más. Gracias a todos mis compañeros, y lo más importante grandes amigos, de laboratorio y comidas. Todos los malos ratos se han convertido en buenos a vuestro lado. Sois muchos pero todos tenéis un lugar destacado en este apartado y, por supuesto, mucho más profundo en mi corazón.

A Almudena, gracias por tu apoyo y alegría en los momentos difíciles. Llevamos muchos años juntas académicamente hablando pero estos últimos nos han unido como amigas. Este año seremos doctoras, prometido.

A Eugenia, por las cálidas conversaciones sobre autoayuda, yoga, positividad, etc. Gracias por tus ánimos y sabios consejos. Te deseo mucha suerte.

A María R., por ser tan especial. Eres una magnífica compañera y amiga, ayudándome siempre que lo necesito. Continuamente me has mostrado el lado positivo de las cosas. A Miguel, por la solidaridad, gran simpatía, cariño y cercanía mostrados desde el principio. He tenido mucha suerte de conocerlos y “convivir” con vosotros.

A Inés, por su apoyo incondicional en las tareas del laboratorio cuando algo no salía bien. Has sido un gran ejemplo para seguir adelante en esta carrera de obstáculos y no lo digo por tu desorden. Eres una persona encantadora y ya, una excelente profesional.

A Irene, por su fuerza, vivacidad y sinceridad transmitidas cada día. A Belén, María M., Nuria y Amanda, por vuestra amistad, solidaridad y comprensión. Gracias a todas por todos los buenos momentos vividos en el laboratorio y las estupendas salidas nocturnas.

Al maravilloso grupo de “punto lab”: Antonio B., Jorge y Juan, por vuestra simpatía y camaradería; a Bea y Loreto, por vuestro afecto y cómplices charlas acerca de nuestros problemas personales y profesionales; y a las nuevas incorporaciones, Juanjo y Cristina, por vuestro compañerismo y entusiasmo.

A Esther, Susana, Virginia y Marta, por compartir risas y amenas tertulias. A Rebeca, por darme su mejor sonrisa todos los días. Y a Antonio M., porque sin saberlo ha sido un modelo de voluntad, haciendo lo que más le gusta a pesar de vivir apartado de su familia.

A Jose y Nicolette, por su frescura, simpatía y algún favor de última hora.

A Miguel Ángel, por ser mi “primer” profesor en el laboratorio y apoyarme en mis inicios. Y a Luis por su generosidad, amabilidad y buenos consejos.

Y en general, a todos los que forman parte del Departamento y alguna vez se han cruzado conmigo porque siempre he encontrado una mano amiga para solucionar alguna dificultad imprevista, trasladar equipos o limpiar destrozos.

A mi gran amiga Arancha, que siempre se preocupa por dónde y cómo estoy. Estas líneas son para que sepas lo mucho que te quiero y extraño.

Por supuesto, agradezco a todos mis amigos que siempre han estado apoyándome durante el doctorado y me han ayudado a relajarme durante los fines de semana y vacaciones, especialmente a Ana H., Noelia, Fernando R., Óscar, Rosa M^a, Jose F., María A., Palacios, Rubén, JuanPe, Almudena, Clara, Fernando C., Revi...

A los padres de Javi, y a Sandra y Lorena, por todos los días, tardes y noches compartidos haciéndome olvidar agobios y problemas. Gracias por aguantar y escuchar pacientemente mis quejas y hacerme reír en numerosas ocasiones.

A mis primos, Choni, Maribel y Felipe, porque siempre han sido un ejemplo de buena educación y saber estar desde pequeña, cuando comía en su casa. Gracias, Choni, por tu compañía, colaboración y disposición para escuchar mis inquietudes.

A mis padres, abuelos y familia en general, por su inestimable e ilimitado apoyo y protección desde mi infancia. Papá, mamá, estoy orgullosa de nuestra relación. Gracias por vuestra entrega. A pesar de la “música” del taller y las interrupciones para limpiar (incluso por encima de mí y el ordenador mientras trabajaba) sé que siempre os tendré cerca apoyándome. Mil perdones por las malas contestaciones y malos humos pero, por desgracia, como imagináis y aunque intentaré controlarlos, sospecho que no serán los últimos. Aquí os pongo todos los besos que nunca os doy. ¡Os quiero y os debo mucho!

A mi amigo más especial y espero mi compañero en la vida, Javi. Tu aliento en los duros momentos ha sido una salvación para mis dudas y preocupaciones. Has sido un sólido pero confortable y comprensivo soporte en el que sujetarme cuando el ánimo fallaba y mi persistente negatividad afloraba. Espero tenerte cerca siempre porque la vida nos ha enseñado muchas cosas durante los años que llevamos juntos pero sobre todo a mí me ha enseñado a valorar y no perder las cosas buenas. GRACIAS.

Y solamente, un simple “gracias” para mi fiel amigo Blacky, por sacarme de casa a pasear cuando más llovía para refrescarme las ideas.

Si a pesar de todo queda alguien olvidado fuera de estas líneas, sepa que el sentimiento de agradecimiento que siento ahora no cabe sólo en cuatro folios blancos y que a él/ella como a todas las personas que en ellos aparecen les estaré eternamente agradecida por ayudarme y formar parte de mi vida.

“Vivir no es sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir”

Gregorio Marañón

“La recompensa del trabajo bien hecho es la oportunidad de hacer más trabajo bien hecho”

Jonas Edward Salk

“I'm an idealist. I don't know where I'm going, but I'm on my way”

Carl Sandburg

“There is only one good, knowledge, and one evil, ignorance”

Sócrates

ÍNDICE



RESUMEN	1
ABSTRACT	7
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	12
II. INTRODUCCIÓN	16
II.1. ESPECIES DE CAZA MAYOR.....	17
II.2. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE ESPECIES DE CAZA MAYOR.....	27
II.2.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN	28
II.3. TÉCNICAS APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CAZA MAYOR EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS	44
II.3.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	44
II.3.1.1. Técnicas electroforéticas	44
II.3.1.2. Técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	49
II.3.1.3. Técnicas espectroscópicas.....	50
II.3.1.4. Técnicas inmunológicas	53
II.3.2. TÉCNICAS GENÉTICAS	57
II.3.2.1. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (PCR-secuenciación).....	57
II.3.2.2. Análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas del ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP).....	61
II.3.2.3. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD).....	62
II.3.2.4. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR- RFLP).....	64
II.3.2.5. PCR con cebadores específicos.....	67
II.3.2.6. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico	69
II.3.2.7. PCR en tiempo real.....	70

III. RESULTS AND DISCUSSION (Published articles)	73
III.1. AUTHENTICATION OF GAME MEATS BY GENETIC TECHNIQUES	74
III.1.1. PCR-RFLP TECHNIQUES	74
III.1.2. PCR USING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS	106
III.1.3. REAL-TIME PCR	123
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
IV.1. AUTENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE ESPECIES DE CAZA MAYOR POR TÉCNICAS GENÉTICAS	156
IV.1.1. TÉCNICA DE PCR-RFLP	157
IV.1.2. TÉCNICA DE PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS	171
IV.1.3. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL	177
V. CONCLUSIONES	188
V. CONCLUSIONS	190
VI. TRABAJO FUTURO	191
VII. BIBLIOGRAFÍA	197

RESUMEN *ABSTRACT*



Los productos cárnicos procedentes de especies de caza mayor son un grupo de alimentos en los que con frecuencia se producen fraudes de sustitución de las especies más valoradas por otras de precio inferior o se declaran porcentajes de mezclas diferentes de los utilizados en su elaboración. Este hecho justifica la necesidad de disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan la adecuada identificación de los productos que se comercializan y la verificación del cumplimiento de las normas de etiquetado.

Entre las técnicas rápidas de reciente aplicación a la identificación de especies en los alimentos destacan las genéticas, basadas en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. De ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es, sin duda, la más utilizada debido a su elevada sensibilidad, rapidez y especificidad. Además, la técnica de PCR permite el análisis de muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización. Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se han utilizado distintas técnicas genéticas (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), PCR con cebadores específicos y PCR en tiempo real) para la detección e identificación de carnes procedentes de las siguientes especies de caza mayor: ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*), corzo (*Capreolus capreolus*), rebeco (*Rupicapra rupicapra*), cabra montés (*Capra pyrenaica*), muflón (*Ovis ammon*) y jabalí (*Sus scrofa*). Asimismo, se aborda su diferenciación de carnes de especies domésticas de consumo habitual como vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*) y cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*).

1. Técnica de PCR-RFLP

1.1. Identificación de ciervo, gamo, corzo, rebeco, muflón/oveja y cabra montés mediante la técnica de PCR-RFLP empleando el marcador genético 12S ARNr

Para cumplir este primer objetivo se eligió el gen mitocondrial 12S ARN ribosómico (ARNr), ya que presenta una longitud y tasa de mutación adecuadas para discriminar especies estrechamente relacionadas. A partir de las secuencias disponibles en las bases de datos del gen 12S ARNr de varias especies de mamíferos, se diseñaron los oligonucleótidos conservados 12S-FW/12S-REV. Estos cebadores amplificaron un fragmento común de 712 pb del gen 12S ARNr de ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés y muflón, así como de otras especies de animales de abasto (vaca, oveja y cabra). La información contenida en las secuencias nucleotídicas amplificadas, facilitó la elaboración de los mapas de restricción de todas las especies elegidas y la posterior selección de las enzimas más adecuadas para llevar a cabo su diferenciación por PCR-RFLP. La endonucleasa *MseI*, y la combinación de las enzimas *MboI*, *BsI* y *ApoI*, permitieron la identificación inequívoca de todas las especies analizadas, exceptuando el muflón y la oveja. Ello fue debido a que las secuencias del gen 12S ARNr de estas dos especies filogenéticamente próximas resultaron ser 100% idénticas.

1.2. Diferenciación de muflón y oveja mediante la técnica de PCR-RFLP empleando el marcador genético D-loop

Para llevar a cabo la diferenciación de muflón y oveja, se seleccionó la región polimórfica D-loop incluida en la región control del ADN mitocondrial. La región control, en especial la zona D-loop, posee una elevada tasa de evolución siendo la principal responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial. El estudio informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de este marcador para diferentes especies animales, permitió el diseño de la pareja de cebadores DLOOP-FW/DLOOP-REV. Estos cebadores amplificaron un fragmento de ADN conservado de entre 700 y 1000 pb en rebeco, cabra montés, muflón, oveja, vaca, cabra y cerdo. El análisis de las secuencias obtenidas en varios individuos de cada especie, hizo posible el diseño de los cebadores MSDLOOP-FW y MSDLOOP-REV para la amplificación de un fragmento específico de 370 pb en muflón y oveja. Tras la amplificación y secuenciación del fragmento específico en distintos individuos de cada especie, se elaboraron los correspondientes mapas de restricción y se eligió la endonucleasa *Maell* para llevar a cabo la diferenciación. El polimorfismo inter e intraespecífico detectado en las secuencias dio lugar a la obtención de un único perfil de restricción para las muestras de oveja, claramente diferenciable de los tres patrones electroforéticos generados en las muestras de muflón.

1.3. Diferenciación de jabalí europeo y cerdo doméstico mediante la técnica de PCR-RFLP empleando el marcador genético MC1R

Debido a la imposibilidad de diferenciar el jabalí europeo del cerdo doméstico con los marcadores mitocondriales 12S ARNr y D-loop, se seleccionó el gen nuclear polimórfico que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*). A partir del alineamiento de las secuencias del gen *MC1R* disponibles en las bases de datos para varias especies de mamíferos, se diseñaron los cebadores MC1R-FW y MC1R-REV para la amplificación de un fragmento de 795 pb específico de jabalí y cerdo doméstico. A continuación, tras un estudio detallado de los mapas de restricción obtenidos en este fragmento para un elevado número de secuencias de jabalíes y cerdos publicadas en las bases de datos, se seleccionaron las endonucleasas *BspHI* y *BstUI* para llevar a cabo la diferenciación. Los resultados obtenidos tras el análisis por PCR-RFLP de 45 individuos de cada subespecie porcina con las enzimas seleccionadas indicaron que el gen *MC1R* puede constituir un marcador adecuado para la diferenciación de carnes procedentes de jabalí europeo y cerdo doméstico.

1.4. Aplicación de una técnica de PCR-RFLP lab-on-a-chip para la identificación de especies de caza mayor empleando el marcador genético 12S ARNr

Con el fin de adaptar y mejorar los resultados obtenidos en la técnica de PCR-RFLP convencional previamente descrita, se empleó la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip*, que incorpora la tecnología convencional de electroforesis capilar a un formato de chip miniaturizado de un solo uso (*LabChip*). El empleo del Bioanalizador *Agilent 2100* (Agilent Technologies Ltd.,

UK), primer instrumento disponible comercialmente en el uso de esta tecnología, ofrece las ventajas de una mayor rapidez y automatización de los datos. Asimismo, mejora la resolución de los perfiles de restricción, permitiendo la visualización de fragmentos de pequeño tamaño (35-50 pb) que no se detectan por la técnica de PCR-RFLP convencional.

2. Técnica de PCR con cebadores específicos

2.1. Identificación de ciervo, gamo y corzo mediante una técnica de PCR con cebadores específicos diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr

La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado con los cebadores conservados 12S-FW/12S-REV en todas las especies de interés, permitió el diseño de tres cebadores directos específicos de ciervo (12SCE-FW), gamo (12SDD-FW) y corzo (12SCC-FW) y uno inverso común (12SCERV-REV) en el gen mitocondrial 12S ARNr. Las parejas de cebadores 12SCE-FW/12SCERV-REV, 12SDD-FW/12SCERV-REV y 12SCC-FW/12SCERV-REV se utilizaron en una técnica de PCR para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de 175 pb, 169 pb y 175 pb en muestras de ciervo, gamo y corzo, respectivamente. Los cebadores demostraron ser específicos para la especie diana, ya que no originaron bandas de amplificación en las especies heterólogas, ni en otras especies como rebeco, cabra montés, muflón, vaca, oveja, cabra, cerdo, conejo, pato, pavo, pollo, oca y caballo.

2.2. Identificación de rebeco, cabra montés y muflón/oveja mediante una técnica de PCR con cebadores específicos diseñados en la región mitocondrial D-loop

Por otra parte, el estudio del alineamiento de las secuencias de la región D-loop obtenidas con los cebadores conservados DLOOP-FW/DLOOP-REV en todas las especies seleccionadas, permitió el diseño de tres parejas de cebadores para la amplificación específica de rebeco (RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV), cabra montés (PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV) y muflón/oveja (OADLOOP-FW/OADLOOPREV). Debe precisarse que debido a la elevada homología existente entre las secuencias D-loop de muflón y oveja, los cebadores OADLOOP-FW/OADLOOPREV se diseñaron para amplificar una región común a ambas especies ovinas. El empleo de los cebadores especie-específicos en una técnica de PCR, originó fragmentos de ADN de 178 pb, 88 pb y 155 pb en las muestras de rebeco, cabra montés y muflón/oveja, respectivamente, sin producir señal de amplificación en el resto de especies analizadas.

El límite de detección de las técnicas de PCR con cebadores específicos descritas (apartados 2.1 y 2.2) se determinó mediante el análisis de mezclas cárnicas binarias experimentales que contenían diferentes porcentajes (0,1, 1, 5, 10 y 25%) de tejido muscular de cada especie diana (ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés o muflón) en una matriz de cerdo. Todas las mezclas se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C, 20 minutos). El límite de detección alcanzado fue del 0,1% para todas las especies, no modificándose cuando se analizaron las mezclas esterilizadas.

3. Técnica de PCR en tiempo real

3.1. *Detección y cuantificación de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas mediante una técnica de PCR en tiempo real empleando la molécula SYBR[®] Green*

Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron tres parejas de cebadores específicos que amplificaban fragmentos de 134 (12SCEQ-FW/12SCEQ-REV), 169 (12SDDQ-FW/12SDDQ-REV) y 120 pb (12SCCQ-FW/12SCCQ-REV) en el gen 12S ARNr de ciervo, gamo y corzo, respectivamente. Como control endógeno para normalizar los valores obtenidos con los cebadores específicos, se emplearon cebadores universales de eucariotas (18SEUDIR/18SEUINV) que amplificaban un fragmento de 140 pb en el gen 18S ARNr. El sistema de detección utilizado fue la molécula SYBR[®] Green, fluorocromo inespecífico que se intercala entre las hebras de la doble hélice de ADN permitiendo cuantificar la producción del amplicón generado. El análisis de las curvas de desnaturalización térmica (curvas de *melting*) obtenidas en distintas especies animales permitió identificar los productos de PCR amplificados, confirmando la especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real diseñados para ciervo, gamo y corzo.

Asimismo, se procedió a la cuantificación de la presencia de ADN de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas binarias, crudas y esterilizadas, que contenían porcentajes del 0,1, 1, 5, 10 y 25% de la especie diana en una matriz de cerdo. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de C_t (ciclo umbral) de las mezclas cárnicas. Los resultados obtenidos en la técnica de PCR en tiempo real desarrollada permitieron la detección y cuantificación del ADN de las especies diana en el intervalo comprendido entre el 0,1-0,8% y el 25%, en función de la especie y del tratamiento térmico aplicado. Se obtuvieron diferentes rectas de calibrado para las mezclas crudas y para las esterilizadas.

3.2. *Detección y cuantificación de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas mediante técnicas de PCR en tiempo real empleando la molécula SYBR[®] Green y sondas TaqMan[®]*

En esta parte del trabajo se describe el desarrollo de dos técnicas de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de rebeco (*Rupicapra rupicapra*) y cabra montés (*Capra pyrenaica*) en mezclas cárnicas. La primera aproximación emplea como sistema de detección el agente fluorescente SYBR[®] Green, mientras que la segunda utiliza sondas TaqMan[®] de hibridación específicas.

Técnica de PCR en tiempo real empleando SYBR[®] Green

Se utilizaron dos parejas de cebadores especie-específicos que amplificaron un fragmento de 133 pb en el gen 12S ARNr de rebeco (12RPQFW/12SRPQREV) y un fragmento de 88 pb en la región D-loop de cabra montés (PIDLOOPFW-PIDLOOPREV). Además, para normalizar los valores obtenidos en la detección específica, se empleó una pareja de cebadores

universales de eucariotas (18SpEUDIR/18SpEUINV) que amplificaba un fragmento de 141 pb en el gen 18S ARNr. La especificidad de los sistemas de PCR específicos de rebeco y cabra montés se confirmó mediante el estudio de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas tras el análisis de los ADNs procedentes de diversas especies animales.

El límite de detección y cuantificación del ADN tras el análisis de mezclas cárnicas binarias (crudas y esterilizadas) de rebeco y cabra montés estuvo comprendido entre el 0,1-0,8% y el 25% dependiendo de la especie diana y del tratamiento térmico aplicado a las mezclas. Como en el caso anterior, el tratamiento térmico influyó en las ecuaciones de cuantificación del ADN de la especie diana.

Técnica de PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan®

Para completar y optimizar los resultados obtenidos en la técnica de PCR en tiempo real anteriormente descrita, se desarrolló una alternativa basada en el empleo de sondas de hibridación TaqMan® para la detección cuantitativa de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas. A diferencia del reactivo inespecífico SYBR® Green, las sondas TaqMan® son oligonucleótidos marcados con fluorocromos en los dos extremos, que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana.

Para cuantificar la presencia de ADN de rebeco en mezclas cárnicas se utilizaron los cebadores 12RPQFW/12SRPQREV y la sonda TaqMan® CHAMOISTM, que permitieron la amplificación y detección de un fragmento específico de rebeco de 133 pb en el gen 12S ARNr. De forma similar, para la detección cuantitativa de cabra montés se emplearon los cebadores específicos de cabra montés PIDLOOPFW-PIDLOOPREV y la sonda TaqMan® IBEXTM, que amplificaron un fragmento específico de cabra montés de 88 pb en la región D-loop. Como sistema de control endógeno para normalizar los valores obtenidos en la detección específica de rebeco y cabra montés, se empleó la pareja de cebadores conservados 18SpEUDIR/18SpEUINV y la sonda TaqMan® conservada de eucariotas 18SPROBE. El sistema endógeno amplificaba un fragmento conservado de 141 pb en el gen mitocondrial 18S ARNr de todas las especies analizadas. Los sistemas de PCR específicos de rebeco y cabra montés dieron lugar a los fragmentos esperados en cada especie diana, sin obtenerse señal de amplificación en el resto de las especies analizadas.

El empleo de las sondas TaqMan® en la técnica de PCR en tiempo real desarrollada aporta ventajas frente al SYBR® Green, ya que mejora la especificidad, eficiencia, sensibilidad y exactitud de los ensayos.

Game meat is a susceptible target for fraudulent labelling due to the economic profit that results from selling cheaper meat as meat from more profitable and desirable species. For this reason, development of accurate methods for determining the animal species in raw and processed meats is highly needed to warrant the quality and authenticity of the meat products offered for sale and to verify the correct labelling of game species.

In the last years, full attention has been turning towards application of DNA approaches for species identification. Among genetic techniques currently applied to meat authentication, polymerase chain reaction (PCR) is the most common approach due to its high power of sensitivity, specificity and speed. Since DNA is a relatively stable molecule, PCR technology allows the analysis of processed or heat-treated samples, including sterilisation. Taking into account these considerations, the aim of this work was to develop several PCR-based techniques (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR using species-specific primers and real time PCR) for the detection and identification of meats from the following game species: red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis ammon*) and wild boar (*Sus scrofa*). The work is also intended to enable the differentiation among these game meats and those from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*).

1. PCR-RFLP techniques

1.1. PCR-RFLP authentication of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon/sheep and pyrenean ibex meats targeting the mitochondrial 12S rRNA gene

The mitochondrial encoded gene for 12S rRNA was selected in this work for meat species identification because it has an adequate length and grade of mutation, exhibiting a typical mosaic structure of phylogenetically conserved and variable regions. To amplify a common DNA fragment from the 12S rRNA gene of all the considered species, primers 12S-FW and 12S-REV were designed based on sequences available in the databases for several animal species. This set of conserved primers produced a 712 bp amplicon on the 12S rRNA gene of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex, mouflon, cattle, sheep and goat species. The information obtained after sequencing and restriction map analysis of the achieved 12S rRNA sequences, allowed the selection of suitable restriction endonucleases for the differentiation of meats from all analysed species by PCR-RFLP. The *MseI* enzyme, and the combination of *MboII*, *BstI* and *ApoI* endonucleases, facilitated unequivocal identification of the considered species, except for mouflon and sheep. This was due to the 100% homology observed in the 12S rRNA sequences of these two phylogenetically close ovine species.

1.2. Discrimination between mouflon and sheep by PCR-RFLP targeting the mitochondrial D-loop region

To carry out the differentiation of meats from mouflon and sheep, the mitochondrial D-loop region was selected because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome. Comparison of mitochondrial D-loop sequences available in the databases for various mammal species allowed the design of DLOOP-FW/DLOOP-REV conserved primer pair. This oligonucleotide set yielded a conserved amplicon (from 700 to 1000 bp) in chamois, pyrenean ibex, mouflon, cattle, sheep, goat and swine. Subsequent sequencing and alignment of the D-loop sequences obtained from various individuals of each species, permitted the design of MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV primers for the selective amplification of a ~370 bp D-loop fragment from mouflon and sheep meats. After sequencing and restriction map analysis of the 370 bp D-loop sequences achieved in mouflon and sheep, *Maell* endonuclease was selected to discriminate both ovine species. The existing inter and intraspecies sequence polymorphisms observed in the target D-loop sequences gave rise to a single *Maell* restriction profile unique to sheep, clearly differentiable from the three electrophoretic patterns obtained in mouflon.

1.3. Differentiation of European wild boar and domestic swine meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes

Due to the impossibility to differentiate between European wild boar and domestic swine on the basis of 12S rRNA and D-loop mitochondrial markers, the polymorphic nuclear gene encoding for the melanocortin receptor 1 (*MC1R*) was targeted for this purpose. The alignment of *MC1R* sequences available in the databanks from various mammal species allowed the design of the primers MC1R-FW/MC1R-REV, aimed for the amplification of a 795 bp specific *MC1R* fragment in wild boar and domestic pig. Restriction maps were then obtained based on various wild boar and domestic pig *MC1R* sequences retrieved from the databases. The few nucleotide differences detected across *Sus scrofa* *MC1R* sequences flanked by MC1R primers, allowed the selection of two endonucleases, *BspHI* and *BstUI*, to carry out the discrimination. The results obtained after PCR-RFLP analysis of 45 individuals of each porcine subspecies with the selected endonucleases showed that the *MC1R* gene is a useful marker for distinguishing between meats from European wild boar and domestic swine individuals.

1.4. Application of PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game meats targeting the 12S rRNA gene

The objective of this study was to adapt and improve a previously described PCR-RFLP technique by replacing the gel electrophoretic steps for DNA fragment analysis by a chip-based nucleic acid separation technology. The Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Ltd., UK) utilises capillary electrophoresis on a microchip device that is capable of rapidly sizing DNA fragments offering a valuable recent development for the analysis of complex DNA banding

patterns. Results obtained in this work indicated that banding resolution of the system was sensitive, with detection of some small DNA fragments (35-50 pb) that were not observed with the conventional PCR-RFLP gel-based method. Owing to its advantages, mainly fast speed, easy handling and automation of the obtained data, the lab-on-a-chip system has the potential to ease standardisation of DNA profiling between laboratories.

2. PCR using species-specific primers

2.1. Identification of red deer, fallow deer and roe deer by PCR amplification using species-specific primers based on the mitochondrial 12S rRNA gene

The information recorded after sequencing and alignment of the conserved PCR fragment obtained with 12S-FW/12S-REV primers in red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex, mouflon, cattle, sheep, goat and swine, permitted the design of specific forward primers for red deer (12SCE-FW), fallow deer (12SDD-FW) and roe deer (12SCC-FW), and a conserved reverse primer (12SCERV-REV) in the mitochondrial 12S rRNA gene. Each 12SCE-FW, 12SDD-FW and 12SCC-FW primer, along with the conserved reverse 12SCERV-REV oligonucleotide, yielded specific amplicons of 175 bp, 169 bp and 175 bp from red deer, fallow deer and roe deer meats, respectively, allowing unequivocal identification of the three cervid species. No amplification signal was observed when heterologous cervid and other analysed species like chamois, pyrenean ibex, mouflon, cattle, sheep, goat, swine, rabbit, duck, turkey, chicken, goose and horse were analysed with the species-specific primers, demonstrating the high specificity of the PCR technique developed.

2.2. Identification of chamois, pyrenean ibex and mouflon/sheep by PCR amplification using species-specific primers based on the mitochondrial D-loop region

Detailed comparison of the D-loop sequences obtained with the DLOOP-FW/DLOOP-REV conserved primers from all selected species, allowed the design of RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV, PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV and OADLOOP-FW/OADLOOP-REV primer pairs, complementary to specific D-loop sequences from chamois, pyrenean ibex and mouflon/sheep meats, respectively. It should be pointed out that due to the high nucleotide homology displayed between mouflon and sheep, the primers OADLOOP-FW and OADLOOP-REV had to be designed targeting a common D-loop fragment of both ovine species. The three species-specific oligonucleotides sets amplified successfully fragments of 178, 88 and 155 bp from chamois, pyrenean ibex and mouflon/sheep meats, respectively. No PCR amplification signal was attained when DNAs from other game and domestic species were tested, confirming the specificity of the designed primer pairs.

Moreover, to determine the detection limit of the species-specific PCR assays developed (sections 2.1 and 2.2), amplifications were performed on series of binary muscle mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, 25 and 100% of each target species (red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex or mouflon) in a swine meat matrix. The detection limit of the PCR

assays was set on 0.1% for all the species in both raw and sterilised (121°C, 20 minutes) meat mixtures.

3. Real-time PCR techniques

3.1. Real-time PCR for detection and quantification of red deer, fallow deer and roe deer in meat mixtures using SYBR® Green as fluorescent dye

To accomplish this objective, three specific primer pairs and a eukaryotic primer set (endogenous control) were combined in a real-time PCR method. Cervid-specific primers for red deer (12SCEQFW-12SCEQREV), fallow deer (12SDDQFW-12SDDQREV), and roe deer (12SCCQFW-12SCCQREV) amplified fragments of 134, 169, and 120 bp in the 12S rRNA gene, respectively. To normalise the values obtained with the specific primer pairs, an endogenous control primer pair based on eukaryotic 18S rRNA gene (18SEUDIR-18SEUINV) was used to amplify a universal DNA fragment of 140 bp. The SYBR® Green molecule, which adheres to the minor groove of the double-stranded DNA in a sequence-independent way, was employed as detection platform of the assay. The specificity of the cervid-primer pairs was verified by post-PCR melting curve analysis of the amplification products from all the selected species immediately after the last reaction cycle.

The sensitivity of the PCR assay for detection and quantification of DNA from red deer, fallow deer and roe deer was established through analysis of meat binary mixtures containing different percentages (0.1, 1, 5, 10 and 25%) of each target species in a swine meat matrix. For each species, a standard curve was determined with the C_t values generated from every meat percentage contained in the binary mixtures. Analysis of experimental raw and sterilised binary mixtures of red deer, fallow deer or roe deer demonstrated the suitability of the assay for the detection and quantification of the target cervid DNAs in the range of 0.1-0.8% and 25%, depending on the species and the treatment applied to the samples. Different calibration curves were obtained in raw and sterilised meat mixtures.

3.2. Real-time PCR for detection and quantification of chamois and pyrenean ibex in meat mixtures using SYBR® Green and TaqMan® probes

In this part of the work, two real-time PCR approaches were developed to quantify the amount of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) DNAs in raw and heat-treated meat mixtures. The first approach uses SYBR® Green as detection platform, whereas the second one employs specific TaqMan® hybridization probes.

Real-time PCR using SYBR® Green

Two sets of specific primers were used to amplify a fragment of 133 bp in the 12S rRNA gene from chamois DNA (12SRPQFW-12SRPQREV) and a fragment of 88 bp in the D-loop region from pyrenean ibex DNA (PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV). Besides, to normalise the values obtained with the specific primer pairs, universal eukaryotic primers

(18SpEUDIR/18SpEUINV), which amplified a 141 bp fragment in the 18S rRNA gene, were utilised as endogenous control system. Each species-specific PCR system was tested for cross-reactivity by post-PCR melting curve analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species.

Analysis of experimental raw and sterilised binary mixtures containing different percentages (0.1, 1, 5, 10 and 25%) of each target species in a swine meat matrix, demonstrated the suitability of the assay for the detection and quantification of the target DNAs in the range of 0.1-0.8% and 25%, depending on the species and the treatment of the meat samples. As in the latest study, the heat-treatment influenced the calibration curves originated in raw and sterilised meat mixtures.

Real-time PCR using TaqMan® probes

In an effort to improve the quantitative detection of chamois and pyrenean ibex in meat mixtures, the species-specific and eukaryotic primer sets used in the previously described real-time SYBR® Green PCR method were adapted to a probe-based real-time PCR format using TaqMan® probes. The difference feature of this method is that probe-based chemistries allow specific detection and quantification of the target by the use of fluorescent labelled sequence specific hybridization probes which will only bind to the desired sequence within the amplicon.

The specific PCR systems were based on the amplification of a 133 bp fragment of the 12S rRNA gene from chamois DNA (12SRPQFW-12SRPQREV) and an 88 bp fragment from the D-loop region of pyrenean ibex DNA (PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV). In this technique, two specific fluorescently labelled TaqMan® probes, CHAMOISTM and IBEXTM, were used in the corresponding PCR systems for chamois and pyrenean ibex detection, respectively. Universal eukaryotic primers (18SpEUDIR/18SpEUINV) were used together with the conserved TaqMan® probe (18SPROBE) as endogenous control to amplify a 141 bp fragment on the nuclear 18S rRNA gene. Each species-specific PCR system was tested for their selectivity and cross-reactivity, showing no cross amplification with DNAs from different game and domestic meat species.

Results obtained showed that the developed real-time TaqMan® assay improves the specificity, sensitivity, efficiency and accuracy of the system with respect to the SYBR® Green format for the quantification of minimal amounts of chamois and pyrenean ibex DNAs in meat.

CAPÍTULO I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR





Las crisis alimentarias ocurridas en los últimos años han demostrado que la identificación del origen de los alimentos es primordial para la protección de la salud de los consumidores. La trazabilidad facilita la retirada de alimentos y permite ofrecer a la población una información específica y precisa sobre los productos implicados. En el Reglamento CE 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DOCE, de 1 de febrero de 2002), se otorga una gran importancia a la trazabilidad de los alimentos y a los mecanismos que la hacen posible. El artículo 18 del citado reglamento establece que para garantizar una adecuada trazabilidad, los alimentos deberán estar correctamente identificados. Asimismo, los reglamentos de Higiene de los Alimentos, entre los que se incluyen el 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios (DOUE, de 30 de abril de 2004), y el 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DOUE, de 30 de abril de 2004), confieren nuevamente una gran importancia a la trazabilidad de los alimentos y de los ingredientes alimentarios como factores clave de seguridad alimentaria.

Garantizar la autenticidad de una materia prima o de un producto transformado es esencial a la hora de implantar sistemas de trazabilidad en la industria alimentaria. Para establecer la autenticidad de un alimento es necesario demostrar que éste se comercializa bajo la denominación a la que realmente corresponde, así como que contiene las materias primas y los porcentajes de ingredientes que se declaran en el etiquetado. La garantía de autenticidad es importante para los consumidores, que esperan que el producto que adquieren cumpla con lo establecido en su etiqueta, así como para las propias industrias y la administración, que deben ejercer un control sobre los productos que se elaboran y comercializan. Con el fin de mejorar la información de los consumidores y respetar la lealtad de las transacciones comerciales, la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (recogida en el Real Decreto 1334/1999, BOE, de 24 de agosto de 1999, y modificada por el Real Decreto 2220/2004, BOE, de 27 de noviembre de 2004), establece, entre otros requisitos, la obligatoriedad de indicar todos los ingredientes presentes en los productos comercializados. Teniendo en cuenta que el etiquetado de un producto alimenticio puede no garantizar su contenido real, resulta indispensable disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan la adecuada identificación de todos sus componentes.

La caza tiene una importante repercusión económica y social, desde su origen como actividad de supervivencia ancestral para el hombre, hasta la actualidad donde se considera no sólo como una actividad de ocio, deporte o turismo de naturaleza, sino como una nueva rama ganadera (ganadería cinegética). En España, el consumo de carne de caza mayor ha aumentado de forma notable en los últimos años debido, en parte, al auge de las explotaciones

ganaderas dedicadas a la cría de especies cinegéticas. Sin embargo, los fraudes de sustitución de carne de caza y productos derivados son muy comunes, debido al beneficio que se obtiene de vender carne de especies menos valoradas por otras más demandadas y de precio superior (Matsunaga y col., 1998; Wolf y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Hoffman y Wiklund., 2006). Este hecho, unido al aumento en las exportaciones de los productos de caza, justifica la necesidad de disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan la adecuada identificación de la carne procedente de estas especies animales (Partis y col., 2000; Mafra y col., 2008). Las especies de caza mayor cuya carne se comercializa en España pertenecen a tres familias: cérvidos, bóvidos y suidos. Los cérvidos incluyen el ciervo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*) y el corzo (*Capreolus capreolus*). Entre los bóvidos destacan el rebeco (*Rupicapra rupicapra*), la cabra montés (*Capra pyrenaica*) y el muflón (*Ovis ammon*), y dentro de los suidos, el jabalí (*Sus scrofa*).

Los métodos analíticos convencionales más utilizados en la identificación de especies animales en productos cárnicos incluyen diversas técnicas basadas en el análisis de las proteínas, como las electroforéticas (Arun y Ugur, 2000; Renon y col. 2003; Montowska y Pospiech, 2007), cromatográficas (Toorop y col., 1997; Chou y col., 2007), espectroscópicas (Kulmyrzaev y col., 2007; Núñez y De la Haba, 2007) e inmunológicas (Chen y Hsieh, 2000; Ayaz y col., 2006). Una de las limitaciones que presentan las técnicas electroforéticas y cromatográficas es que pueden generar perfiles proteicos complejos y bastante similares para las distintas especies animales, dificultando su correcta identificación (Vallejo y col., 2005). Por su parte, las técnicas espectroscópicas requieren equipos sofisticados y análisis de calibración exhaustivos (Núñez y De la Haba, 2007). Con relación a las técnicas inmunológicas, los resultados obtenidos son más sencillos de interpretar, aunque su principal problema se presenta cuando los productos que se analizan han sido sometidos a tratamientos térmicos que desnaturalizan las proteínas (Rao y col., 2008).

Alternativamente, las técnicas genéticas y, concretamente, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una estrategia idónea para la detección e identificación de especies animales en los alimentos. Los métodos genéticos de identificación de especies presentan importantes ventajas frente a las técnicas basadas en el análisis de proteínas. Fundamentalmente, la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, el mayor grado de variabilidad genética examinado y la posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización. Estas propiedades han convertido a las técnicas de PCR en un sistema óptimo para identificar y cuantificar la presencia de una determinada especie animal, tanto en productos crudos, como en aquéllos sometidos a distintos tratamientos de procesado (Matsunaga y col., 1999; Hird y col., 2003; Lanzilao y col., 2005). Las técnicas de PCR convencionales son útiles para la identificación y la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla. Sin embargo, la metodología de PCR en tiempo real

es más adecuada cuando se pretende cuantificar el porcentaje de incorporación de una especie en un producto (Laube y col., 2007; Rodríguez y col., 2005).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta tesis doctoral se plantea la utilización de técnicas de PCR y PCR en tiempo real para la detección e identificación de las principales especies de caza mayor cuyas carnes se comercializan en España: ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés, muflón y jabalí. Asimismo, se aborda la diferenciación de estas especies de carnes procedentes de especies domésticas de consumo habitual como vaca, oveja, cabra y cerdo. Para ello, los objetivos que se pretenden conseguir son los siguientes:

- 1) **Selección de marcadores genéticos** adecuados. Se emplearán los genes mitocondriales 12S ARNr y D-loop, y el marcador nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*).
- 2) **Desarrollo de técnicas de PCR-RFLP** convencional y PCR-RFLP *lab-on-a-chip* que permitan la identificación específica de carnes procedentes de todas las especies de interés. Para ello será necesario:
 - Amplificar por PCR los marcadores seleccionados y secuenciar los amplicones correspondientes a varios individuos de cada especie.
 - Analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas y elegir endonucleasas que permitan, en cada caso, la obtención de perfiles de restricción especie-específicos.
- 3) **Desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos** para la identificación de las especies de caza mayor objeto de estudio en mezclas cárnicas crudas y sometidas a tratamientos térmicos. Para ello será necesario:
 - Amplificar por PCR fragmentos de ADN conservados en todas las especies elegidas y secuenciar los productos de PCR correspondientes a distintos individuos de cada especie.
 - Analizar las secuencias obtenidas y diseñar cebadores especie-específicos.
 - Emplear los cebadores diseñados en técnicas de PCR para la detección específica de las especies de interés en mezclas cárnicas.
- 4) **Desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real** para detectar y cuantificar la presencia de ciervo, gamo, corzo, rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas empleando dos sistemas de detección diferentes: el intercalador fluorescente SYBR[®] Green y las sondas de hibridación TaqMan[®].

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN



II.1. ESPECIES DE CAZA MAYOR

El Real Decreto 1095/1989, de 8 de septiembre de 1989, recoge las especies que pueden ser objeto de caza en nuestro país y establece las normas para su protección (BOE, de 12 de septiembre de 1989). Asimismo, el Real Decreto 1118/1989, de 15 de septiembre de 1989, incluye las especies de caza comercializables (BOE, de 19 de septiembre de 1989). Dichas especies se clasifican en dos grandes grupos: “caza menor”, que integra a las especies de tamaño igual o inferior al zorro, y “caza mayor”, para las especies de tamaño superior.

Las principales especies de caza mayor cuya carne se comercializa en nuestro país pertenecen a tres familias: cérvidos, bóvidos y suidos. Los cérvidos incluyen el ciervo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*) y el corzo (*Capreolus capreolus*). En la familia de los bóvidos destaca el rebeco (*Rupicapra rupicapra*), la cabra montés (*Capra pyrenaica*) y el muflón (*Ovis ammon*) y, dentro de los suidos, el jabalí (*Sus scrofa*). Todos ellos pertenecen al grupo de ungulados salvajes artiodáctilos, que incluye especies con un número par de pezuñas en cada una de sus extremidades (*Figura 1*).

CÉRVIDOS

Los cérvidos son rumiantes herbívoros que habitan en Europa, Asia, América, norte de África y algunas zonas árticas. En esta familia se incluyen numerosas especies de tamaño muy variable, siendo el alce (*Alces alces*) el mayor, y el pudú sudamericano (*Pudu puda*) el más pequeño. Como ya se ha señalado, las especies más comunes en Europa son el ciervo, el gamo y el corzo.

• El ciervo

El ciervo común o venado (*Cervus elaphus*) es una especie ampliamente distribuida por todo el Hemisferio Norte, de la que se han documentado cerca de 30 subespecies distintas. En Europa se reconocen 12 subespecies de ciervos, aunque se han producido numerosos cruzamientos entre ellas. En España, los ciervos ibéricos están incluidos dentro de las subespecies *C. elaphus hispanicus*, circunscrito en las Marismas del Guadalquivir, y *C. elaphus bolivari*, que ocupa el resto de la península ibérica. Ambas subespecies mantienen un linaje genético más puro que otras poblaciones europeas debido a la dificultad para atravesar la escarpada orografía de la Península Ibérica (Rodríguez, 1993).

El ciervo es un animal robusto, bien conformado y de porte majestuoso y altivo. Presenta un evidente dimorfismo sexual, siendo las hembras más pequeñas y menos corpulentas que los machos (*Figura 2a*). Las cuernas de los machos se renuevan cada año, y su tamaño y número de puntas va aumentando a medida que avanza la edad del animal. El color del pelo es normalmente pardo, salvo en el vientre y glúteos, donde es más blanquecino.

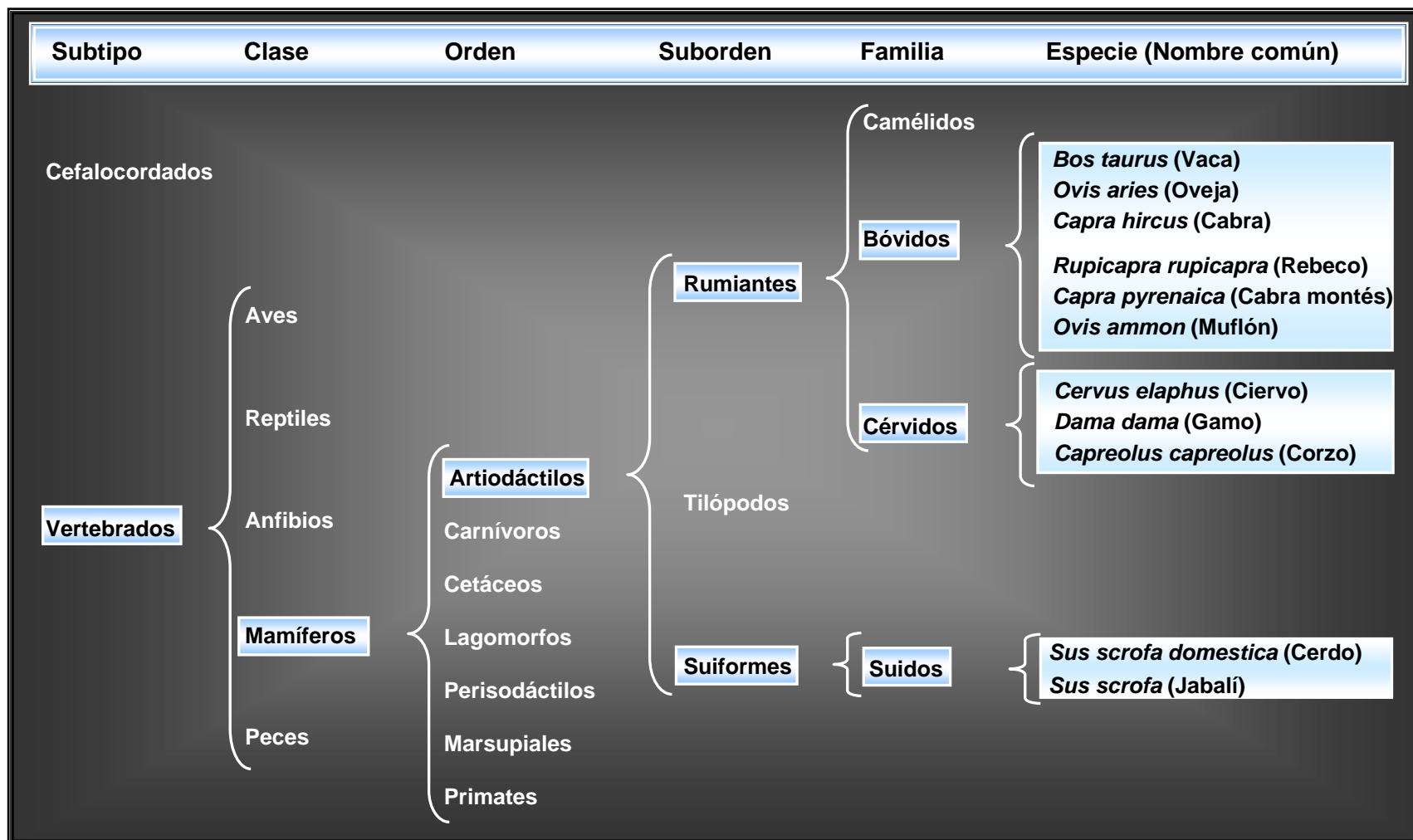


Figura 1. Clasificación taxonómica de las principales especies animales de abasto y de caza mayor de consumo humano.

Los ciervos son animales sociales que forman grupos en función de su edad y sexo. Las hembras viven en manadas de decenas de ejemplares con sus retoños más jóvenes, mientras que los machos se mueven de forma solitaria o en grupos reducidos de menos de 5 individuos. Sólo se acercan a las hembras en la época de celo (entre agosto y septiembre), momento en que comienzan a mostrar sus deseos de reproducirse por medio de la berrea y luchan con otros machos por el control de un harén. A comienzos de verano, las ciervas preñadas paren una o dos crías. Los cervatos presentan una coloración rojiza con manchas y rayas blancas, que les ayuda a esconderse de los depredadores. A los 2 años las ciervas ya son adultas, mientras que los machos alcanzan la madurez a los 3 años de vida. Alrededor de los seis años, los ciervos completan su desarrollo corporal (Granados y col., 2001a).

• **El gamo**

El gamo común o europeo (*Dama dama*) es un cérvido nativo del área mediterránea. En la actualidad, los gamos se localizan en Europa central, las Islas Británicas y el sur de la Península Escandinava y Finlandia. Se han introducido también en otros países como Estados Unidos, Perú, Chile, Argentina, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. En España, el gamo no es una especie autóctona, aunque actualmente ocupa numerosas áreas pequeñas y aisladas del territorio peninsular como Burgos, los Montes de Toledo y la Sierra de Cazorla-Segura.

Habitualmente, se diferenciaban dos subespecies de gamo: *D. dama dama*, común en Europa, y *D. dama mesopotamica*, originaria de Oriente Medio y en peligro de extinción. Sin embargo, recientemente, se han catalogado como dos especies distintas: *D. dama* y *D. mesopotamica* (Braza, 2003).

El gamo se diferencia del ciervo común por su menor tamaño, su bello manto de pelo pardo-rojizo salpicado de motas blancas y sus astas palmeadas (*Figura 2b*). La cola se caracteriza por su longitud y su dorso oscuro. El pelo se vuelve más oscuro y ligeramente grisáceo en invierno, aunque en el vientre, glúteos y parte inferior de las patas permanece blanco todo el año. La hembra es más pequeña que el macho y carece de cuernos. A veces se encuentran algunos individuos completamente blancos (albinos), siendo rarísimos los ejemplares negros (melanismo).

Al contrario que otros cérvidos de su tamaño, el gamo no forma manadas sino que vive en grupos familiares de menos de 10 individuos, o bien lleva una vida solitaria. Un macho se une a uno de estos grupos durante la época de celo, normalmente en octubre, donde es muy llamativo el fenómeno de la ronca del gamo. En junio las hembras preñadas paren una cría, rara vez dos o incluso tres. Las crías o gabatos nacen con un pelaje pardo muy oscuro y un moteado blanco que les sirve para mimetizarse en la naturaleza. A los seis meses empiezan a despuntar en el macho las protuberancias de las que saldrán las cuernas. Las hembras son fértiles a los 16 meses de vida y los machos entre los 7 y 14 meses, aunque con mínimas posibilidades de

procrear hasta pasados unos años debido al control jerárquico que ejercen en el harén los machos adultos de 7 o más años (Braza, 2003).

- **El corzo**

El corzo europeo (*Capreolus capreolus*) se distribuye por la mayor parte de Europa oriental y central (especialmente en España, Dinamarca, Austria, Alemania y Gran Bretaña) y una franja de Asia central que llega hasta el Pacífico. Su gran capacidad de adaptación a todo tipo de hábitats, incluso islas, ha potenciado la amplia distribución de la especie, ocupando actualmente territorios en los que su presencia era desconocida.

En la Península Ibérica, los principales núcleos poblacionales de corzos ocupan la Cordillera Cantábrica, los Pirineos y los Sistemas Ibérico y Central, zonas desde las que la especie se encuentra en proceso de expansión. Asimismo, se pueden encontrar reductos poblacionales en los Montes de Toledo, Sierra Morena, el este de Extremadura y en las sierras andaluzas de Jaén y Cádiz. Los estudios llevados a cabo hasta el momento (Randi y col., 2004) apuntan a que no existe una diferenciación clara entre los corzos ibéricos y los centroeuropeos, considerándose ambos tipos dentro de la subespecie nominal denominada *C. capreolus capreolus*.

El corzo se caracteriza por su grácil y esbelto aspecto, además de por su reducido tamaño, siendo el cévido más pequeño de Europa. Es de color leonado en verano y gris rojizo en invierno, destacando en sus cuartos traseros una amplia mancha blanca denominada escudo anal. En su hocico se distingue el maxilar inferior de tonalidad clara y un característico bigote negro (Figura 2c). Los machos adultos poseen dos cuernas pequeñas y ahorquilladas hacia la punta y emiten un sonido llamado “ladrido”, por su similitud al de los cánidos.

El período de celo de los machos se prolonga cada año durante casi 6 meses (de abril a septiembre). La reproducción del corzo viene condicionada por el fenómeno de la diapausa embrionaria, por la cual el óvulo permanece flotando en el útero de la hembra desde el momento de la fecundación (julio-agosto) hasta principios del invierno. Es entonces cuando empieza un ciclo de gestación normal, produciéndose los partos a finales del mes de abril. Las crías o corcinos nacen con un pelaje salpicado de manchas blancas y negras que irán desapareciendo con la edad. Las corzas son fértiles al primer año de vida y carecen de climaterio, lo que significa que hasta que terminan sus días continúan pariendo (Mateos-Quesada, 2005).

BÓVIDOS SALVAJES

En este grupo se incluyen rumiantes herbívoros de talla media y constitución robusta y ágil. Su característica morfológica diferencial es la presencia de auténticos cuernos, en los que el núcleo óseo se recubre de un estuche córneo que acompaña al animal durante todo su ciclo vital.

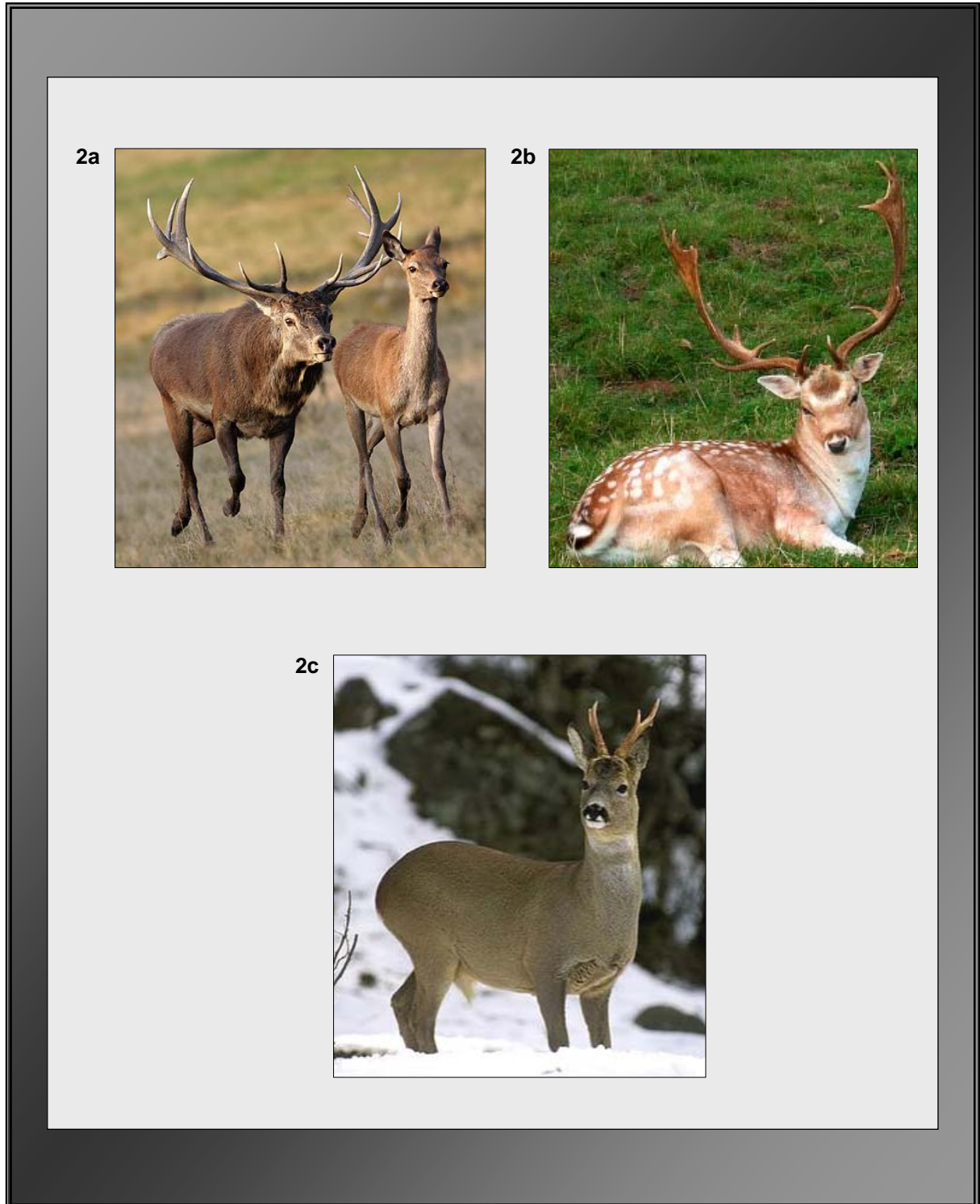


Figura 2. Cérvidos salvajes: (2a) ciervo (*Cervus elaphus*), (2b) gamo (*Dama dama*) y (2c) corzo (*Capreolus capreolus*).

En Europa, se consume carne de las siguientes especies: rebeco (*Rupicapra rupicapra*), cabra montés (*Capra pyrenaica*) y muflón (*Ovis ammon*).

- **El rebeco**

El rebeco (*Rupicapra rupicapra*) es un animal de gran potencia física y excelente agilidad para deambular por terrenos escarpados. Las cuernas, presentes tanto en machos como en hembras, nacen hacia arriba y se curvan fuertemente hacia atrás como un par de ganchos. Las pezuñas del rebeco son finas y altamente versátiles para poder subir por las rocas y el hielo. Su manto es denso y marrón oscuro en invierno, aclarándose durante el verano. Como particularidad (*Figura 3a*), destaca una mancha clara en la zona del ano y las carrilladas son blancas.

Los rebecos son típicos del piso subalpino. Los grupos de rebecos están formados por machos o por hembras con sus crías. Durante la época de celo (de octubre a noviembre) los grupos de machos se unen a los de hembras surgiendo entonces fuertes enfrentamientos entre los primeros, que luchan cabeza contra cabeza por el derecho a reproducirse. La gestación dura alrededor de 20 semanas, al término de las cuales nace una sola cría. Ésta se destetará a los dos meses y alcanzará la madurez sexual entre los 2 y 4 años (Hansen-Catta y col., 2002).

La especie *Rupicapra rupicapra* está presente en zonas montañosas de Europa como los Cárpatos, los Alpes y el Cáucaso, además de en los Balcanes, Eslovaquia y Turquía. Actualmente, se reconocen diez subespecies que coinciden más o menos con los macizos montañosos que ocupan: *R. rupicapra asiatica* (Turquía), *R. rupicapra cartusiana* (Macizo de Chartreuse, en Francia), *R. rupicapra caucasica* (Cáucaso), *R. rupicapra rupicapra* (Alpes), *R. rupicapra carpatica* (Cárpatos), *R. rupicapra ornata* (Apeninos), *R. rupicapra balcanica* (Balcanes) y *R. rupicapra tatrica* (Montes Tatra, en Eslovaquia y Polonia). En la Península Ibérica destacan dos subespecies, *R. rupicapra pyrenaica* (Pirineos) y *R. rupicapra parva* (Cordillera Cantábrica).

- **La cabra montés**

La cabra montés (*Capra pyrenaica*) es una especie única en el mundo, propia de la Península Ibérica. Al igual que otros bóvidos, presenta un fuerte dimorfismo sexual. Los machos adultos tienen una cara más alargada y la típica barba de chivo oscura bajo la mandíbula. Las hembras son mucho más pequeñas, se asemejan a una cabra doméstica y sus cuernos son cortos. Los cuernos de los machos, en cambio, son notablemente gruesos y pueden llegar a ser el triple de largos que los de las hembras (*Figura 3b*). El color y longitud del pelaje varía según las subespecies y la época del año, tornándose más largo y grisáceo en invierno. Las pezuñas de la cabra montés presentan la superficie interna antideslizante y los extremos duros y agudos, características que les permiten desplazarse por paredes rocosas de enorme verticalidad.

La cabra montés es un animal sociable, cuya manada puede estar constituida por machos adultos, hembras con sus crías o ejemplares jóvenes de ambos sexos. Los machos y las hembras adultas se reúnen en la época de celo, en los meses de noviembre y diciembre, durante la cual tienen lugar duros combates entre los machos contendientes. Las crías (una por parto) nacen todas en mayo. La hembra llega a la madurez sexual a los 18 ó 24 meses, pudiendo parir anualmente hasta que alcanzan los 10 ó 12 años de edad. Los machos son fecundos a los 2 años aunque con pocas posibilidades de copular hasta los seis.

En la Península Ibérica se han descrito cuatro subespecies de cabra montés (Granados y col., 2001b) que se diferencian por la distribución de las manchas negras del pelaje de los machos y la longitud y sección transversal de la cornamenta. La *C. pyrenaica lusitanica* y la *C. pyrenaica pyrenaica* (Bucardo), ya extinguidas, ocupaban las montañas fronterizas entre Galicia y Portugal y los Pirineos franceses y españoles, respectivamente. Actualmente, únicamente se encuentran dos subespecies en nuestro territorio: la *C. pyrenaica hispanica*, distribuida de forma heterogénea por las cordilleras cercanas al Mar Mediterráneo, con mayor concentración en Sierra Nevada, y la *C. pyrenaica victoriae*, que aparece de forma desigual en las cordilleras del centro y norte de España, situándose su principal población en la Sierra de Gredos.

• **El muflón**

El muflón (*Ovis ammon*) es, según todos los indicios, el ancestro de la actual oveja doméstica (*Ovis aries*), por lo que ambas especies comparten numerosas características morfológicas y filogenéticas (Hiendleder y col., 1998; 2002).

Son animales bastante grandes, semejantes a una oveja doméstica estilizada, de patas y cuello proporcionalmente más largos. La lana es mucho más corta y de color pardo oscuro, volviéndose con el tiempo blanquecina en morro, ojos, mitad inferior de las patas, glúteos y vientre. Los machos son más grandes y robustos que las hembras y están dotados de grandes cuernos que se curvan a ambos lados de la cabeza (*Figura 3c*). Las hembras, en cambio, no presentan cuernos o son de escasa longitud. Los machos tienen un pelaje largo en el cuello, pecho y parte anterior de las patas delanteras y se caracterizan por presentar una mancha blanquecina en la zona lateral del lomo denominada "silla de montar", que en las hembras es menos patente. El escudo anal está bien marcado y la cola es negra y corta (Cassinello, 2003).

Como ocurre con la mayoría de las ovejas salvajes, el muflón suele localizarse tanto en zonas montañosas como en áreas rocosas y pedregosas situadas a 1.000-1.500 metros de altitud. Es una especie social donde cada individuo dentro de la manada posee un estatus jerárquico relacionado con edad, fortaleza y experiencia reproductiva. Los rebaños suelen ser mixtos y relativamente grandes en comparación con otras especies de ungulados, aunque la agrupación varía en número dependiendo de varios factores, como la estación del año o la disponibilidad de alimento. En el periodo de celo y gestación (de noviembre a marzo) el tamaño

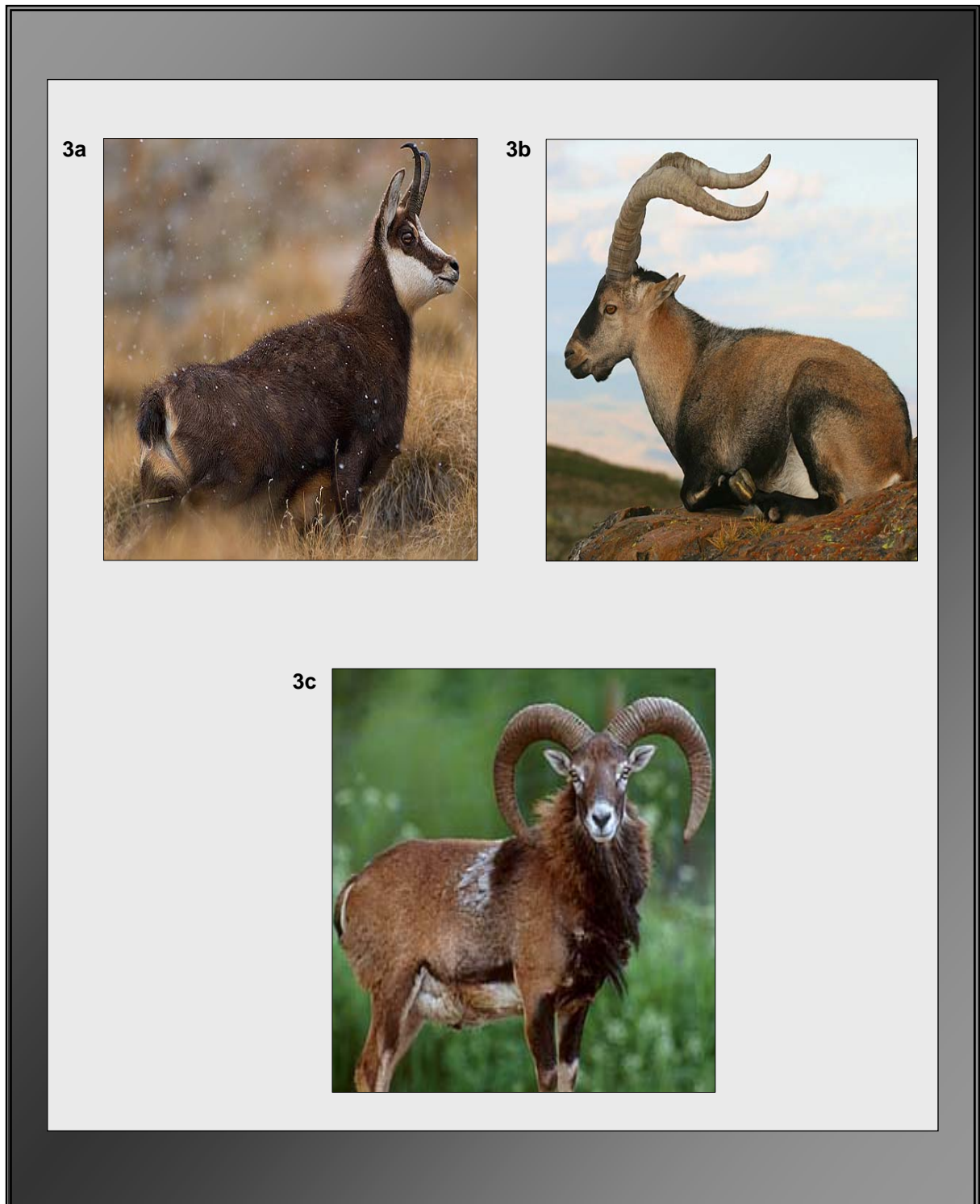


Figura 3. Bóvidos salvajes: **(3a)** rebeco (*Rupicapra rupicapra*), **(3b)** cabra montés (*Capra pyrenaica*) y **(3c)** muflón (*Ovis ammon*).

medio de los grupos oscila entre 10-12 individuos, aunque se pueden localizar grupos de hasta 30. Las hembras de muflón no se reproducen hasta que tienen 2-3 años de edad, mientras que los machos no suelen aparearse hasta que no alcanzan los 5-7 años, momento en el que ya han obtenido suficiente estatus social.

Los animales que constituyen el género *Ovis* forman parte de poblaciones muy polimorfas y su clasificación taxonómica es heterogénea y confusa, especialmente en el caso del muflón europeo (*Ovis ammon*). Basándose en criterios genéticos, morfológicos, osteológicos y geográficos, se han considerado dos especies de muflones (Pfeffer, 1967): *Ovis canadiensis*, localizada en las montañas del noreste de Siberia y Norteamérica (de Alaska hasta el norte de México) y *Ovis ammon*, originaria de las islas de Córcega, Cerdeña y Chipre. Esta última presenta una gran variabilidad individual como consecuencia de su amplia distribución, ya que además de Europa, se extiende por las montañas del Asia central, oeste de China y el Himalaya, hasta Irán y Asia Menor. Así, la especie *Ovis ammon* está integrada por siete subespecies: *Ovis ammon musimon* (muflón europeo), *Ovis ammon gmelini* (muflón de Asia Menor), *Ovis ammon orientalis* (muflón de Afganistán), *Ovis ammon poloi* (muflón de las montañas de Asia central), *Ovis ammon ammon* (muflón de Rusia y Mongolia), *Ovis ammon kozlovi* (muflón del Gobi meridional) y *Ovis ammon hodgsoni* (muflón del Tíbet).

Los primeros ejemplares de muflón traídos a la Península Ibérica procedían de Córcega y se soltaron en el Coto Nacional de Cazorla en 1953. Desde entonces, esta especie se ha utilizado para repoblar numerosos cotos y reservas nacionales, destacando su presencia en Cuenca, los Montes de Toledo, Sierra Morena, Extremadura y Tarragona.

SUIDOS SALVAJES

- ***El jabalí***

El jabalí (*Sus scrofa*) pertenece a la familia de los suidos, dentro de la misma especie que el cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) (Giuffra y col., 2000). Presenta un aspecto compacto y está provisto de una cabeza grande y alargada en la que destacan unos ojos muy pequeños. El cuello del jabalí es grueso, las patas muy cortas y los cuartos delanteros están más desarrollados que los traseros, a diferencia del cerdo doméstico que tiene más desarrollada la parte posterior de su cuerpo donde se localizan las piezas de mayor valor comercial (*Figura 4*). El cuerpo del jabalí está recubierto por un manto cerdoso de color castaño oscuro. Las crías (jabatos o rayones) tienen un pelaje beige con rayas negras longitudinales de la cabeza a la cola, que desaparecen a lo largo de los primeros meses de vida. Su pelo se oscurece con el tiempo, pasando del rojo en los primeros meses de vida (bermejitos), al marrón y negro en los ejemplares adultos. Los machos de jabalí desarrollan unos llamativos dientes caninos cuyo examen determina la edad del ejemplar.

4a



4b



Figura 4. Suidos salvajes y domésticos: (4a) jabalí (*Sus scrofa*) y (4b) cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*).

Durante el período de celo (de noviembre a enero) el jabalí macho busca hembras receptivas de un modo tan activo que a veces llega a olvidarse de su propia alimentación. En caso necesario, lucha contra sus rivales para conquistar a las hembras, generalmente dos o tres, pero en ocasiones hasta ocho. Normalmente todas las hembras tienen el celo de forma sincronizada. Tras cuatro meses de gestación, la jabalina pare de cuatro a siete jabatos. Las crías abandonan el lecho del nido a la semana de edad, se destetan alrededor de los dos meses y alcanzan la madurez sexual sobre los ocho o diez meses.

Las investigaciones más recientes sugieren que hay 17 subespecies dentro de la especie de jabalí más abundante, *Sus scrofa*. Tres de ellas incluyen ejemplares localizados en diferentes zonas de nuestro país: a) *S. scrofa scrofa*, con una distribución que abarca desde el centro de la Península Ibérica hasta el norte de Europa, con Polonia, República Checa, Eslovaquia, Hungría y Rumania como límites septentrionales; b) *S. scrofa meridionalis* localizado en Andalucía, además de las islas de Córcega y Cerdeña; y c) *S. scrofa algira* presente en Túnez, Argelia, Marruecos y los territorios españoles del norte de África. Actualmente, el jabalí es el ungulado más abundante y extendido de la Península Ibérica, apareciendo la mayor concentración de animales en la zona sur de España (Rosell y col., 2001).

II.2. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE ESPECIES DE CAZA MAYOR

El creciente interés de los consumidores por mantener una dieta sana con un menor aporte calórico ha aumentado la demanda de carnes de caza, cuya composición y propiedades las convierten en una alternativa saludable a las carnes que proceden de animales de abasto. Hay que señalar que bajo la denominación genérica de “carne de caza” se diferencian dos grupos, la carne de caza silvestre y la carne de caza de granja. La primera procede de las especies cinegéticas que se mantienen en condiciones no domésticas, siendo objeto primordialmente de caza deportiva, aunque posteriormente su carne pueda ser comercializada y consumida. La carne de caza de granja es la que proviene de aquellas especies sometidas a una producción controlada, equiparable a la de los animales domésticos, cuya explotación se desarrolla bajo dos vertientes. Por un lado, como fuente directa de carne y otros productos que siguen los circuitos comerciales convencionales y, por otro, como sistemas de repoblación de estaciones naturales y cinegéticas, pudiendo ser posteriormente objeto de caza deportiva.

La composición nutritiva de la carne de caza mayor es muy variable dependiendo de factores como la especie, edad, sexo, origen y tipo de alimentación de los animales. No obstante, posee una serie de características comunes que la distinguen de la carne procedente de animales de abasto de consumo habitual: a) contiene menos grasa intramuscular, con una mayor proporción de ácidos grasos insaturados y generalmente un menor contenido de colesterol; b) presenta un mayor porcentaje de proteínas de alto valor biológico; y c) tiene un

elevado contenido en hierro, cobre, calcio y fósforo (*Figura 5*). Por otro lado, la carne de caza mayor carece de residuos procedentes de hormonas, antibióticos y otros fármacos que se utilizan con mayor frecuencia en los animales de abasto (Zomborszky y col., 1996; Hoffman y Wiklund, 2006).

La carne de caza mayor presenta, por lo general, un sabor intenso y un color rojo más oscuro que la carne procedente de especies domésticas. Además, posee un típico olor “a caza”, definido por la combinación de olor a campo y olor sexual. En cuanto a la textura, es habitualmente menos tierna que la de los animales domésticos, aumentando su dureza con la edad del animal. La crianza en granjas de las especies de caza mayor permite obtener un producto más homogéneo y de textura más tierna. Sin embargo, el sabor de su carne es menos intenso debido a la alimentación controlada que reciben estos animales (Aidoo y Haworth, 1995).

De todas las carnes de caza, la de ciervo, es sin duda, la más consumida en el mundo. La carne de ciervo se considera una *delicatessen* y ofrece una opción dietética novedosa y saludable con perspectivas de creciente demanda en el mercado internacional. En España, la mayor parte de la carne de cérvidos que se consume procede de animales salvajes abatidos en monterías.

En cuanto a la carne de jabalí, hay que decir que posee unos atributos claramente diferentes a la del cerdo doméstico, a pesar de proceder ambas de la misma especie animal. Es una carne magra y proteica (*Figura 5*), con un menor contenido graso y una fracción de ácidos grasos poliinsaturados más elevada. Presenta un color rojo más oscuro y un sabor característico más intenso que la carne de cerdo (Marchiori y De Felício, 2003). Al igual que los cérvidos, la mayor parte de la carne de jabalí que se consume en nuestro país procede de animales silvestres.

Debido a que el jabalí es el ancestro del cerdo doméstico (Giuffra y col., 2000), ambas subespecies se pueden cruzar dando lugar a individuos mestizos o híbridos. Los animales obtenidos como resultado de estos cruces se pueden asemejar en apariencia al jabalí puro, pero su carne tiene un mayor contenido de grasa y colesterol (De Caro y Vieites, 2001).

Las carnes procedentes de bóvidos salvajes como el rebeco, el muflón y la cabra montés se consumen considerablemente menos que las de cérvidos y jabalí. Presentan una textura más dura y un sabor generalmente más fuerte. La más apreciada es la carne de muflón, ya que la obtenida de individuos jóvenes recuerda a la de oveja (Walter y col., 2004).

II.2.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Los últimos datos disponibles en el Anuario de Estadística Agroalimentaria del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (*Tabla 1*) muestran un destacado aumento de las capturas de ciervo y jabalí, cuadruplicándose prácticamente entre los años 1986 y 2002.

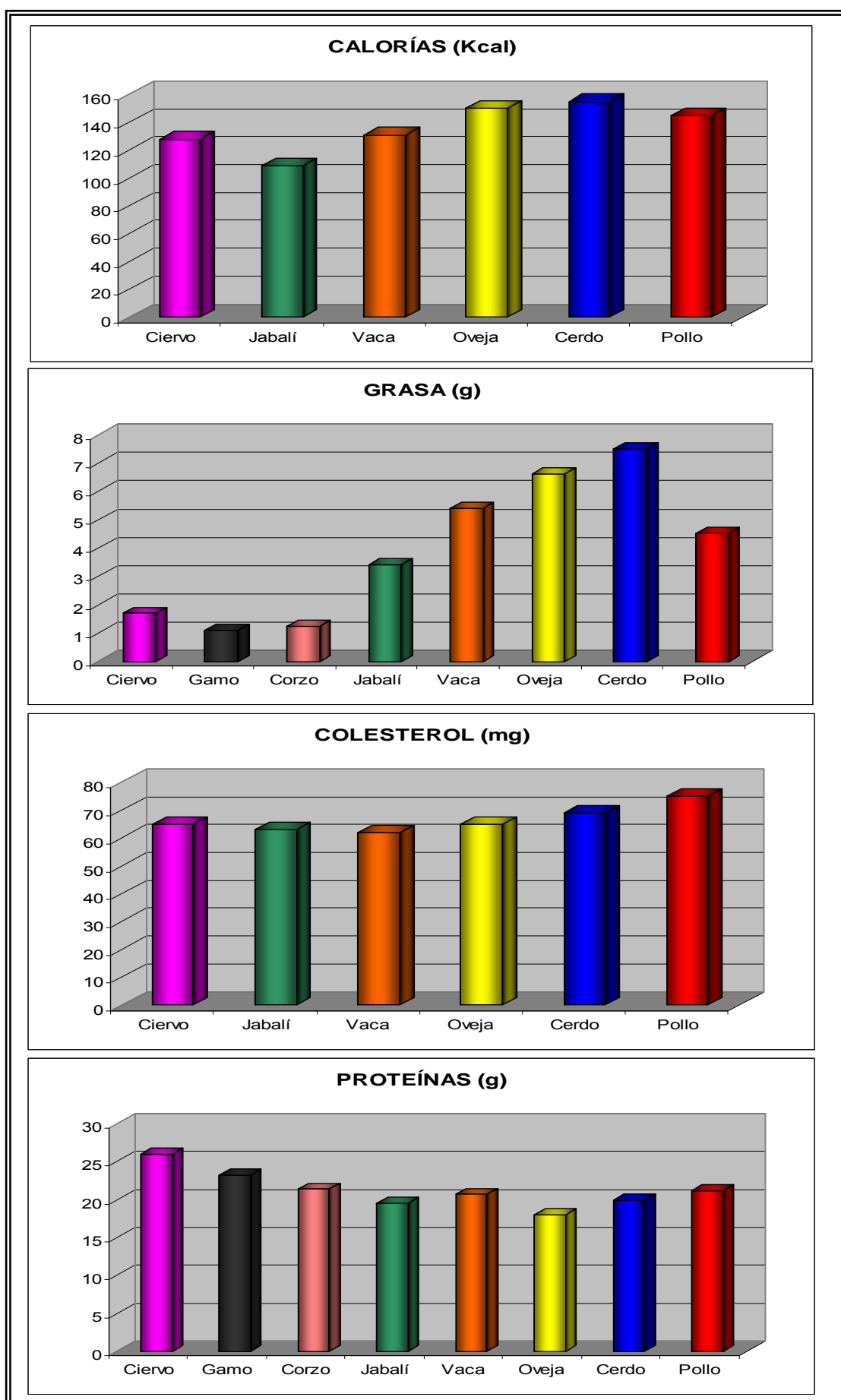


Figura 5. Valor nutritivo de 100 gr de carne magra procedente de especies de caza mayor y de abasto. Fuente: *Walter y col., 2004; Moreiras y col., 2008*

Por su parte, las capturas que aparecen en el epígrafe de la tabla denominado *Otra Caza Mayor*, que incluiría las especies de gamo, corzo, rebeco, cabra montés y muflón, se han multiplicado por seis en el periodo 1986-2002. Hay que mencionar que en esta apreciación no se ha incluido el año 2003 ya que se considera un periodo atípico, aunque sí se muestra en la tabla.

Las *Figuras 6 y 7* ofrecen una visión global de los datos incluidos en la *Tabla 1*. En ellas se muestra cómo el número total de capturas procedentes de especies de caza mayor se ha multiplicado por cuatro (*Figura 6*) y los ingresos totales obtenidos por valor de las piezas cobradas han aumentado casi seis veces (*Figura 7*) durante los años 1986 y 2002.

Según los datos más recientes recabados por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, las Comunidades Autónomas españolas donde se capturó un mayor número de animales y se registraron mayores ingresos durante los años 2002 y 2003 fueron Andalucía, Castilla-La Mancha, Extremadura y Castilla León (*Figura 8*) (MAPA, 2004).

A estos datos, que corresponden a los animales abatidos en monterías, habría que sumar los procedentes de las explotaciones ganaderas de especies como ciervo, gamo y jabalí, cuya producción está fundamentalmente destinada al consumo de carne.

Hay que señalar que en comparación con otros sectores productivos, el sector de la carne de caza de granja se caracteriza por la escasez de datos concretos y contrastados sobre producción y comercialización. No obstante, se puede afirmar que gracias al reciente desarrollo de técnicas de manejo de cérvidos y jabalíes, es factible la explotación intensiva en granja de estas especies. Ello ha permitido la comercialización de productos de elevada calidad que gozan de gran demanda en el mercado internacional. Como ya se ha mencionado, la carne de caza procedente de explotaciones intensivas posee unas características propias y distintas de aquéllas que proceden de animales salvajes, constituyendo una alternativa rentable a la ganadería tradicional (Bertolini y col., 2005).

En Europa, los principales países productores de carne de caza mayor se localizan en Polonia, Austria, Hungría, Eslovenia, Reino Unido y, en menor medida, Alemania y Francia. Fuera de Europa, los principales productores son Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos, Canadá, Argentina y Chile.

• **Producción de carne de cérvidos**

El ciervo es la especie de caza mayor que cuenta con un mayor número de granjas en el mundo, dado que es un animal de fácil manejo que se adapta bien a todo tipo de hábitats. La producción de ciervo es perfectamente compatible con otros tipos de ganado y, aunque es más frecuente su cría en sistemas extensivos, no tiene dificultad en incorporar prácticas intensivas. Los gamos también se crían en diferentes partes de Europa, Nueva Zelanda y Australia. En cuanto al corzo, las granjas existentes sólo tienen finalidad cinegética, ya que son animales de

Tabla 1. Datos de capturas e ingresos económicos de la caza mayor

		1986	1988	1990	1992	1994	1996	1998	2000	2002	2003
CIERVO	Nº CAPTURAS (miles)	18	29	27	34	48	61	47	43	70	60
	INGRESOS (millones de €)	6,5	11,1	11,6	21,2	21,4	25,4	22,5	18,4	32,9	31,6
JABALÍ	Nº CAPTURAS (miles)	35	38	50	69	92	81	115	113	122	119
	INGRESOS (millones de €)	4,7	5,7	7,2	11,5	17,6	17,9	17,1	18,3	19,3	15,7
OTRA CAZA MAYOR	Nº CAPTURAS (miles)	3,8	4,2	5,3	8,3	10,9	14,2	15,4	21,5	23,5	29,8
	INGRESOS (millones de €)	0,9	1,3	1,9	4,6	10,3	6,0	6,3	5,8	4,7	5,4
TOTAL INGRESOS CAZA MAYOR (millones de €)		12	18	21	37	49	49	46	43	57	53

Fuente: *Anuario de Estadística Agroalimentaria (MAPA, 2004)*

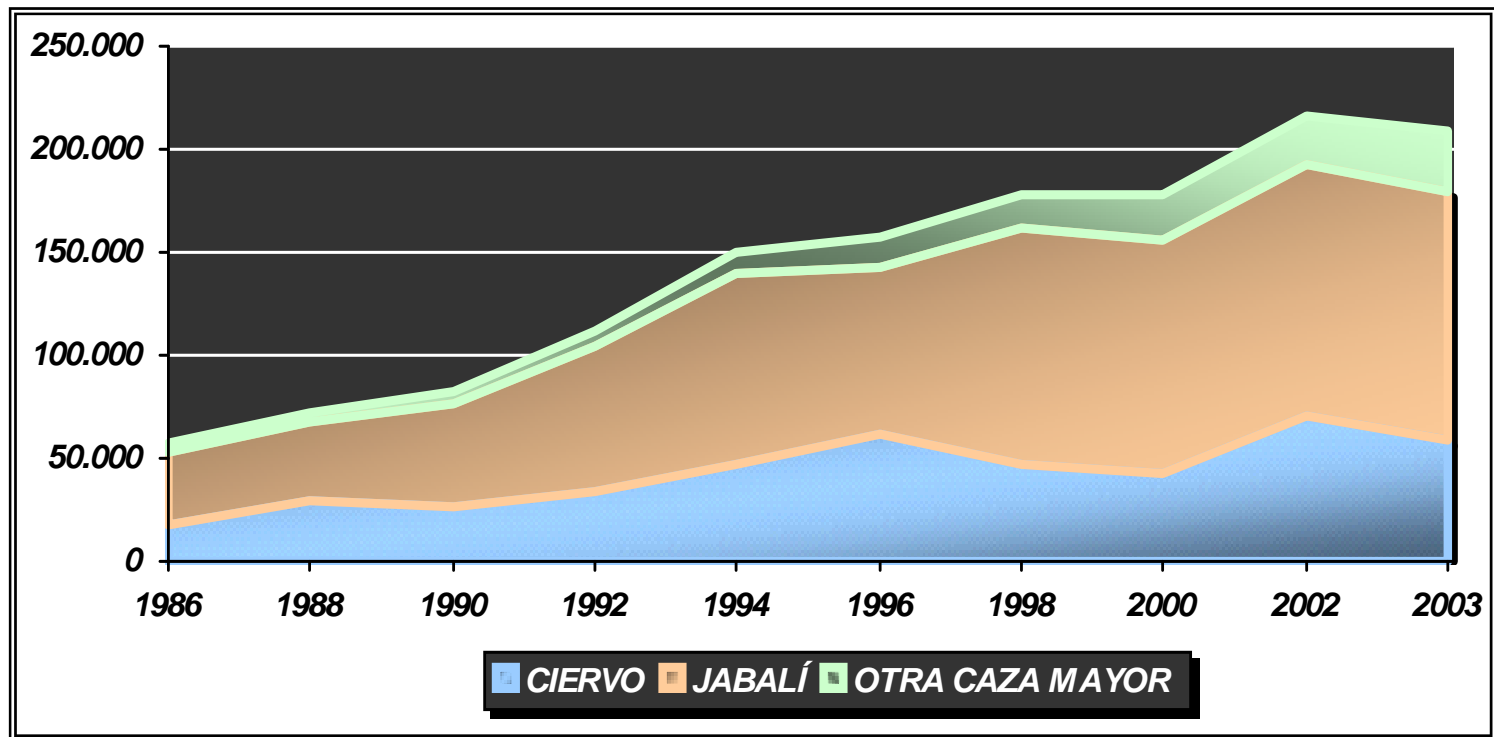


Figura 6. Número total de capturas de especies de caza mayor durante el periodo 1986-2003 (MAPA, 2004).

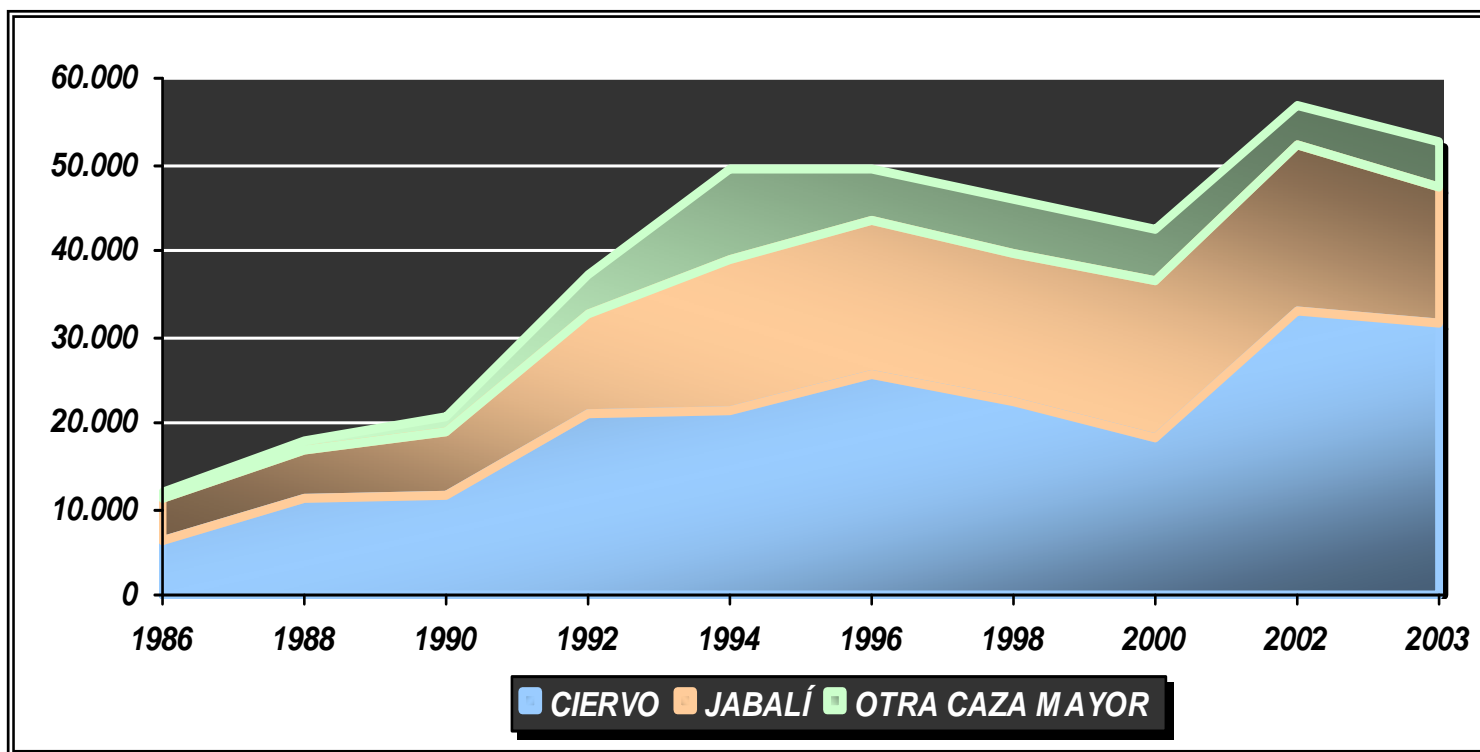


Figura 7. Ingresos totales de caza mayor (miles de €) durante el periodo 1986-2003 (MAPA, 2004).

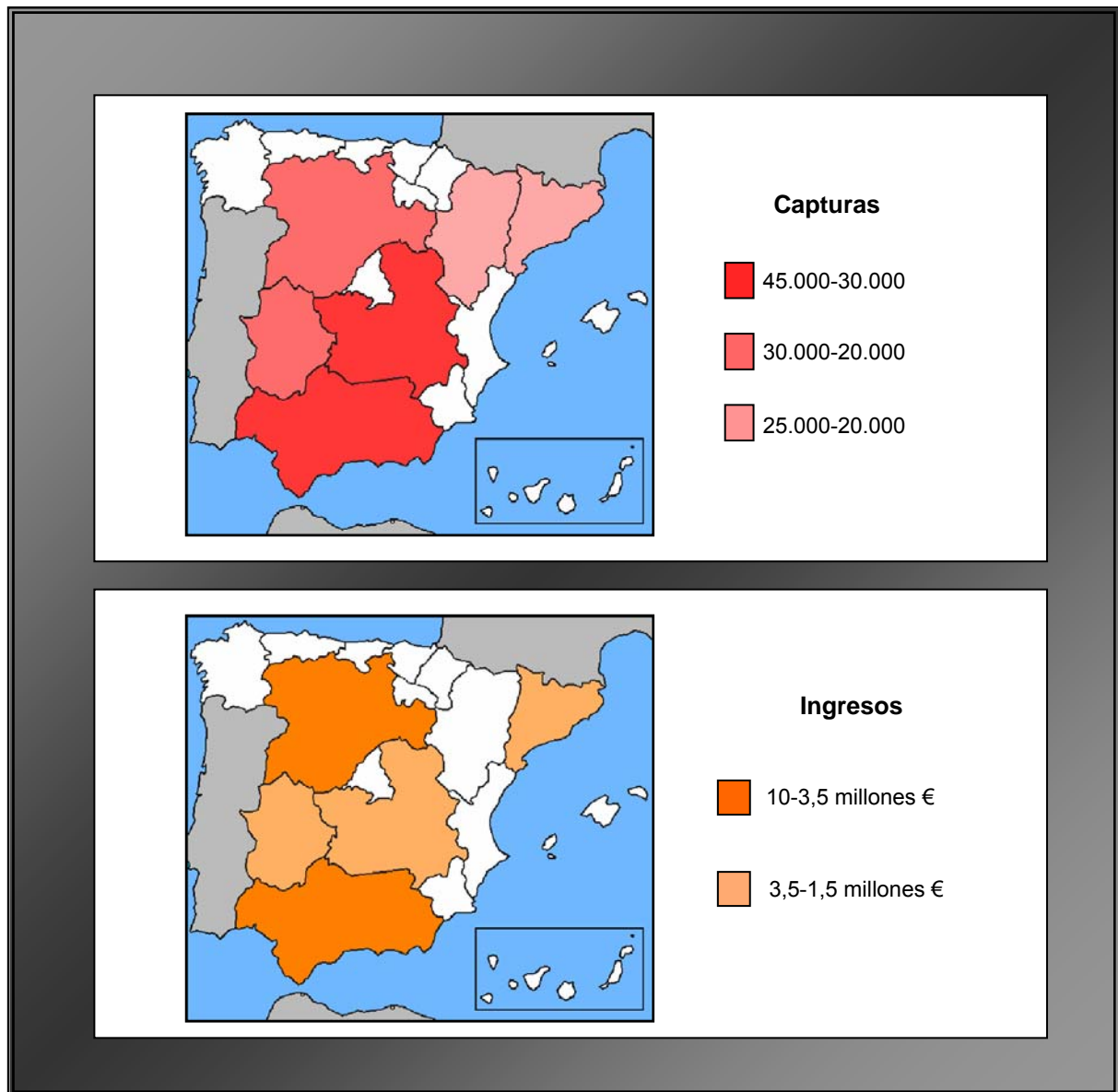


Figura 8. Capturas e ingresos por piezas cobradas registradas en España durante los años 2002 y 2003. Fuente: *Anuario de Estadística Agroalimentaria* (MAPA, 2004)

manejo difícil debido a su comportamiento alimenticio selectivo.

La cría de cérvidos en granjas para la producción de carne tiene su origen a principios de 1970 en Nueva Zelanda, desde donde comienzan las exportaciones hacia Europa occidental. Los principales países europeos pioneros en la comercialización de carne de ciervo son Alemania y Escocia (Fletcher, 1997; Hoffman y Wiklund, 2006).

Actualmente, el principal país productor de carne de cérvidos es Nueva Zelanda, seguido por Estados Unidos, Australia, Canadá y Reino Unido. Los países con mayores volúmenes de importación son Alemania, Francia, Suiza, Bélgica, Estados Unidos y algunos países asiáticos (Figura 9). Nueva Zelanda posee la mitad del total de cérvidos de cría del mundo (1,8 millones de cabezas) predominando la explotación del ciervo común (85%), “wapiti” (*Cervus canadensis*) y gamo (Tabla 2). Más del 90% de los productos de ciervo obtenidos en este país se exportan a Escandinavia y a Europa occidental, principalmente Alemania (Theunissen y Valentine, 2003). Por otra parte, en Estados Unidos se estima que hay unos 250.000 ejemplares de cérvidos, incluyendo el ciervo axis (*Axis axis*) (34%), el gamo (24%), el ciervo común (13%), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (15%) y el “wapiti” (4%). La cabaña de cérvidos de Australia cuenta con unas 200.000 cabezas, en su mayoría gamos (49%) y ciervos comunes (39%). Al menos el 85% de toda la carne de venado producida en Australia es exportada, principalmente, a Europa. En Canadá, hoy en día, existen unos 162.000 animales, de los cuales la especie más abundante es el “wapiti” (57%), seguida del gamo (15%) y el ciervo de cola blanca (13%). Dicho país puede llegar a ser líder mundial de producción de carne de venado, ya que al igual que Nueva Zelanda goza de grandes extensiones de pastos idóneos para este fin (Hoffman y Wiklund, 2006).

En Europa, la situación de las granjas de cérvidos es variable según los países. Alemania es el mercado importador de carne de ciervo más importante del mundo y es el primer consumidor de carne de caza mayor en Europa. Este país importa unas 20.000 toneladas de carne de venado anuales, de las cuales el 80% proviene de Nueva Zelanda. Las explotaciones de cérvidos de Alemania cuentan con una producción dedicada, en su mayoría, a la cría de gamos. Reino Unido tiene una producción de carne de ciervo estable, a pesar de la crisis existente en otros sectores cárnicos. Particularmente en Escocia, casi todos los animales criados en granja son ciervos escoceses (*Cervus elaphus scoticus*), mientras que en Inglaterra se cría mayoritariamente el ciervo común (77%) y el resto son gamos (23%) (Rose, 2001). En Francia e Irlanda, muchas explotaciones de carne de cérvidos están desapareciendo ya que el volumen de producción es superior a la demanda del mercado. Sin embargo, en los países del norte de Europa (Suecia, Noruega, Finlandia y Bélgica) y del este (Hungría, Polonia y Croacia) el número de granjas dedicadas a la producción de carne de cérvidos está experimentando un paulatino incremento (Konjevic, 2007).

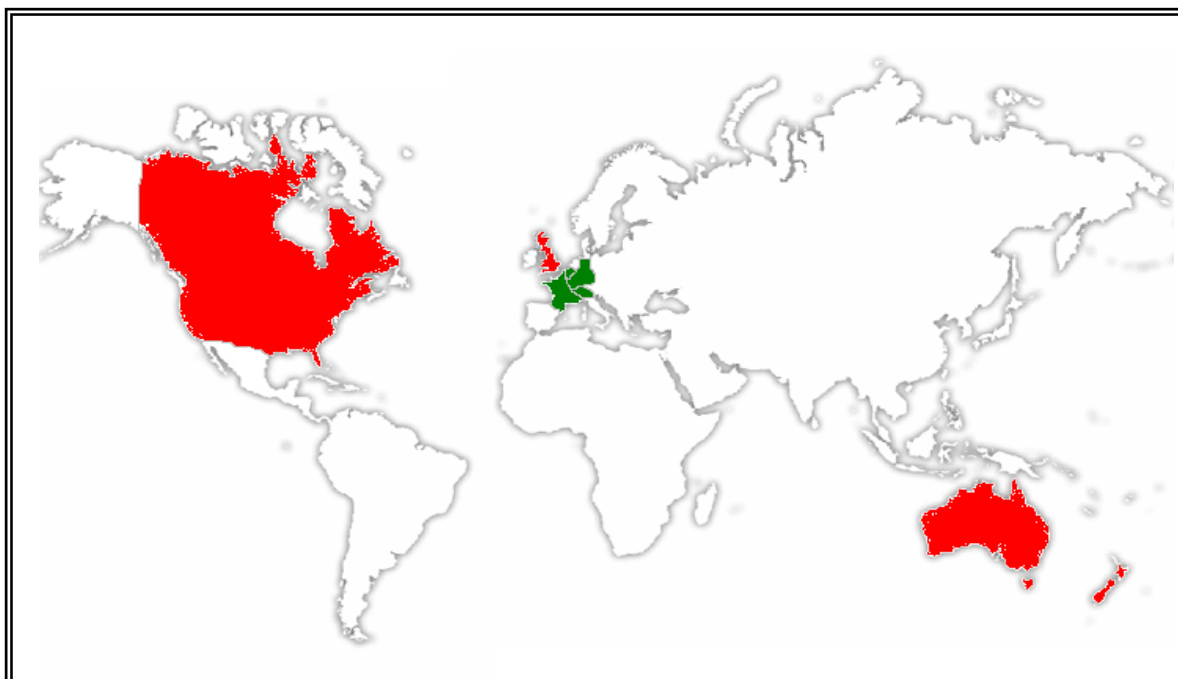


Figura 9. Principales países productores (rojo) y consumidores (verde) de carne de cérvidos del mundo.

Tabla 2. Principales países productores de carne de cérvidos

País	Nº estimado de granjas	Nº estimado de cabezas
Nueva Zelanda	4.320	1,84 millones
Estados unidos	—	250.000
Australia	1.200	200.000
Canadá	1.700	162.000

Fuente: *Theunissen y Valentine, 2003; Hoffman y Wiklund, 2006*

Por lo que respecta a España, aunque la mayor parte de la carne que se consume procede de animales abatidos en monterías, en los últimos años han surgido algunas explotaciones dedicadas a la cría de especies cinegéticas con el único fin de comercializar su carne. Hasta donde llega nuestra información, existen actualmente dos explotaciones de carne de venado en nuestro país, cuyo modelo de producción se asemeja al de países como Nueva Zelanda. Dichas granjas están situadas en Segovia y Teruel, donde se crían ciervos de las subespecies escocesa (*Cervus elaphus scoticus*) y centroeuropea (*Cervus elaphus germanicus*). Las explotaciones españolas cuentan con alrededor de 200 ciervos que producen, aproximadamente, 12.000 kg de carne al año. La creciente demanda de carne de cérvidos en nuestro país, indica que este tipo de granjas puede suponer una alternativa a la ganadería tradicional (Cortijo, 2003; Rodríguez y col., 2004).

- **Producción de carne de jabalí**

Como en el caso del ciervo, el jabalí es una especie idónea para su cría en explotaciones de tipo ganadero debido a su gran resistencia a las enfermedades, así como a sus menores necesidades alimenticias y mejor índice de conversión que el cerdo doméstico (Bertolini y col., 2005). La mayoría de las granjas de jabalíes existentes en el mundo están destinadas a la repoblación de cotos de caza.

La cría de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) se puede establecer básicamente en dos tipos de sistemas. Uno de ellos corresponde a la producción extensiva, que simula las condiciones del ambiente natural del animal y, el otro, consiste en un sistema semi-intensivo semejante al de producción al aire libre, que intenta compatibilizar las características propias del animal con unos márgenes superiores de producción gracias a la suplementación alimenticia y al manejo dirigido de los animales. Este tipo de cría empezó a desarrollarse en los años 80 y está afianzada en países como Canadá y Chile. En la Comunidad Europea, existe un mercado establecido desde hace ya algunas décadas con una demanda constante de carne de jabalí. Inglaterra, Francia e Italia, destinan la explotación del jabalí a la producción de carne, mientras que las granjas ubicadas en Alemania y España tienen fines cinegéticos. En los últimos años, Portugal también ha implantado granjas para comercializar carne de jabalí (Vieites y col., 2003).

En relación al comercio exterior, Australia, Estados Unidos y Europa son importantes exportadores de carne de jabalí. Australia tiene una población estimada entre 7 y 9 millones de cabezas, con un rendimiento anual que oscila entre 500.000 y 1,5 millones de kg de carne. Europa, además, importa cerca de 3.000 toneladas de carne de jabalí anualmente.

Una práctica que se realiza con cierta frecuencia en los sistemas de producción porcina, es el cruzamiento intencionado de jabalíes con hembras de cerdo doméstico con el fin de conseguir un mayor nivel productivo (ganancia de peso, índice de conversión, fertilidad y tamaño de camada). En estos casos, la camada resultante de mestizos manifiesta las características

fenotípicas del jabalí puro, cuya carne tiene menos grasa y colesterol que la de los híbridos. La comercialización de carne procedente de estas crías como jabalíes puros constituye un fraude económico (De Caro y Vieites, 2001).

- **Situación del mercado de la carne de caza mayor**

Según datos disponibles en el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, la carne y productos cárnicos se sitúan entre los grupos de alimentos de mayor consumo en España, representando un 21,4% del gasto total en alimentación en 2005 (16.688 millones de euros) (*Figura 10*). De acuerdo a esta misma fuente, el consumo de carne en nuestro país se ha mantenido estable en los últimos años registrados en el Libro de la Alimentación Española (2000-2005), con valores que se acercan a los 66 kg por persona y año. No obstante, el consumo de carnes de especies de caza mayor, que se incluirían en el apartado de “otras carnes”, se ha incrementado en un 5% durante dicho periodo (*Tabla 3*) (MAPA, 2005).

Los únicos datos disponibles sobre la cotización de las carnes de especies cinegéticas (ciervo, gamo, muflón y jabalí) son los que se establecen en las sesiones anuales celebradas en la Lonja Agropecuaria de Ciudad Real. Estas sesiones suponen una referencia para todo el territorio nacional, ya que reúnen a productores y compradores de todas las comunidades autónomas. Como se observa en la *Tabla 4*, el precio de las carnes de caza mayor ha sufrido un aumento en los últimos años. La carne más cotizada es la de ciervo, seguida en orden decreciente por la de gamo, jabalí y muflón. No obstante, hay que señalar que el valor de la carne procedente de animales silvestres es todavía muy inferior al de la obtenida en las granjas de cría (Rodríguez y col., 2004).

En los últimos años, la Oficina Nacional de la Caza (ONC) ha puesto en marcha el proyecto denominado “Buenas Prácticas en el Manejo y Tratamiento de la Carne de Caza Silvestre”. Este plan cuenta con la colaboración de un amplio abanico de sectores (cazadores, veterinarios, empresas cárnicas, hostelería, etc.) y sus objetivos consisten en potenciar el adecuado cumplimiento de las normas higiénico-sanitarias que afectan a la cadena productiva y fomentar el consumo de la carne de caza entre la población española.

Finalmente, cabe señalar que aunque la mayoría de la carne procedente de especies de caza mayor se exporta y comercializa congelada y envasada al vacío, la industria cárnica ofrece numerosas posibilidades de elaboración de una amplia gama de productos entre los que destacan patés, hamburguesas, jamones curados, escabeches, estofados, embutidos (crudos curados o cocidos), etc. (*Tablas 5 y 6*). De ellos, los embutidos crudos curados, elaborados principalmente a partir de carne de ciervo y jabalí, entre otros ingredientes, son los productos de caza mayor más demandados por el consumidor (Cooper, 2002; Bertolini y col., 2005).

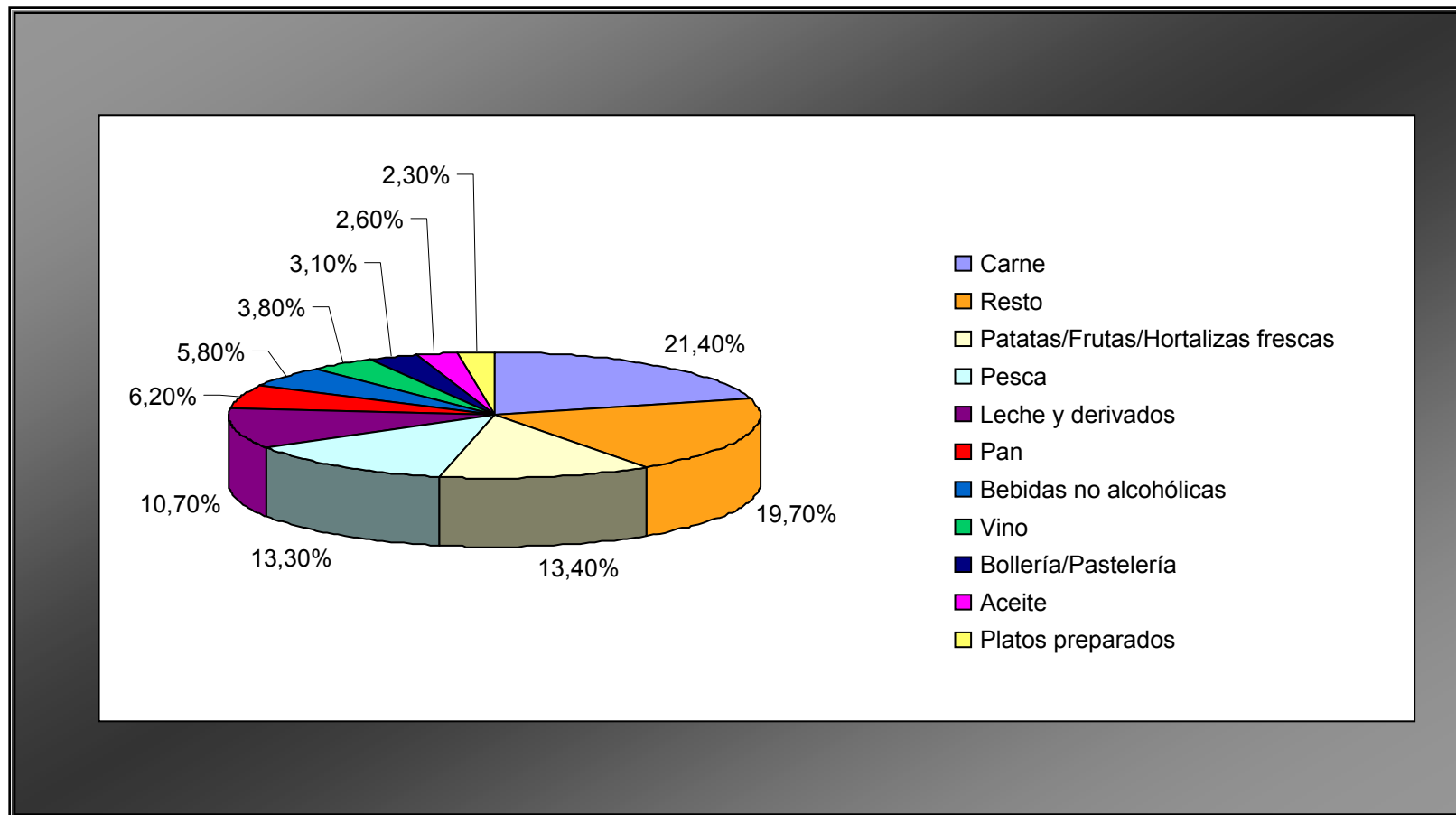


Figura 10. Distribución del gasto en alimentación en España durante el año 2005.

Fuente: *Libro de la Alimentación Española* (MAPA, 2005)

Tabla 3. Evolución del consumo de carnes en España

PRODUCTO	2000	2005
	kg/cápita	kg/cápita
CARNES FRESCAS	48,6	49,1
Pollo	16,7	16,1
Cerdo	13,3	13,5
Vacuno	9,8	10,2
Ovino y caprino	3,4	3,2
Conejo	1,8	1,7
Otras carnes	2,5	3,1
CARNES TRANSFORMADAS	15,8	14,9
CARNES CONGELADAS	1,2	1,8
TOTAL CARNES	65,5	65,9

Fuente: *Libro de la Alimentación Española (MAPA, 2005)*

Tabla 4. Cotización en lonja de la carne de caza mayor (€/kg) en los últimos años

Año Especies	2001	2002	2005	2006	2007	2008
Ciervo	1,05-1,15	1,30	1,20-1,25	1,10 - 1,20	1,90 - 2,00	2,00-2,3
Gamo	0,95-1,05	0,95-1,05	1,00	0,80 - 0,90	1,60 - 1,70	1,70 - 1,90
Jabalí	3	1,20	1,10-1,15	1,00 - 1,10	1,20 - 1,30	0,90-1,10
Muflón	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40

Fuente: Lonja Agropecuaria de Ciudad Real (2008)

Tabla 5. Selección de los principales productos comercializables crudos elaborados con carne de caza mayor




Producto		Especie	Ejemplo de presentación	
CARNE FRESCA O CONGELADA ENVASADA AL VACÍO		Ciervo, gamo, corzo, jabalí, muflón		
EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS	CECINA	Ciervo, corzo, rebeco, cabra montés, jabalí		
	CHORIZO	Ciervo, jabalí		
	SALCHICHÓN	Ciervo, jabalí		

Tabla 6. Selección de los principales productos comercializables tratados térmicamente elaborados con carne de caza mayor

Producto		Especie	Ejemplo de presentación		
TRATADOS TÉRMICAMENTE	JAMÓN FILETEADO Y AHUMADO	Ciervo, jabalí			
	CARNE AHUMADA	Ciervo, jabalí			
	ESTOFADO	Ciervo, corzo, jabalí			
	EN ESCABECHE O ACEITE DE OLIVA	Ciervo, jabalí			
	PATÉ	Ciervo, corzo, jabalí			
	OTRAS CONSERVAS	Ciervo, corzo, rebeco, jabalí			

II.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CAZA MAYOR EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

En el sector de las carnes de caza, los fraudes de sustitución son muy comunes debido al beneficio que se obtiene al vender las especies más valoradas por otras de precio inferior (Matsunaga y col., 1998; Brodmann y col., 2001). Por ello, la puesta a punto de métodos de análisis eficaces, rápidos y baratos que permitan identificar la especie animal de procedencia en estos productos, permitiría prevenir posibles fraudes y ofrecer una mayor protección a las empresas de importación y exportación, industrias de transformación y consumidores (Pascal y Mahé, 2001; Teletchea y col., 2005).

Las técnicas utilizadas para la identificación de especies animales se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas basadas en el **análisis de proteínas** y las que se centran en el análisis del ADN o **técnicas genéticas** (Ulberth, 2004; Swägele, 2005). Si bien los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados, los grandes avances que se han producido en los últimos años en las técnicas de biología molecular, han impulsado el rápido desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito a la identificación de especies animales en los alimentos.

II.3.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Los métodos de identificación de especies basados en el análisis de proteínas incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), las técnicas espectroscópicas y las técnicas inmunológicas.

II.3.1.1. Técnicas electroforéticas

La electroforesis es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El movimiento de las proteínas dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis. Aquellas moléculas que tengan una carga neta mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En el caso de que ésta sea igual, las moléculas menores se desplazarán con mayor rapidez.

La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de muestras de referencia. La comparación puede ser visual, o bien utilizando un densitómetro o un analizador de imágenes. Habitualmente, para comparar los patrones de bandas es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas, ya que pequeños

cambios en las condiciones experimentales pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos (Vallejo y col., 2005).

Para la identificación de especies animales en la carne y productos cárnicos se pueden utilizar diversas técnicas electroforéticas, dependiendo del grado de resolución que se desee obtener, así como del tipo de tratamiento que haya experimentado el producto durante el procesado. Las más utilizadas son la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), el isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis capilar (EC) (Montowska y Pospiech, 2007).

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) es, sin duda, uno de los procedimientos más extendidos para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La técnica de SDS-PAGE consiste en disolver las proteínas de la muestra en soluciones de un detergente aniónico desnaturizante como el dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulphate*, SDS). De este modo, las proteínas pierden sus cargas individuales adquiriendo una carga neta negativa como resultado del complejo *proteína-anión* SDS formado. La cantidad de detergente que se incorpora por unidad de masa es la misma para todas las proteínas y, en consecuencia, la movilidad en la electroforesis va a depender exclusivamente de la masa. La separación de las proteínas, una vez disueltas, se hace en geles de poliacrilamida a los que se incorpora también SDS.

Parisi y Aguiari (1985) emplearon la electroforesis de las proteínas musculares fibrilares y sarcoplásmicas para identificar el origen animal de diferentes muestras cárnicas. De este modo, la técnica de SDS-PAGE permitió la identificación de vaca, oveja, cabra, ciervo y conejo gracias a los diferentes patrones obtenidos para la miosina, actina, α -actinina, troponina y tropomiosina en las distintas especies animales analizadas.

Savage y col. (1995) utilizaron la técnica de SDS-PAGE para identificar la procedencia animal de carnes recuperadas mecánicamente (frescas y tratadas térmicamente) de vaca, cordero, cerdo, pollo y pavo.

Rahman y col. (2007) identificaron por SDS-PAGE patrones de proteínas característicos de buey, búfalo, oveja y cabra.

La ventaja de la técnica de SDS-PAGE con relación a otros métodos de análisis de proteínas radica en que puede emplearse para la identificación de especies en muestras sometidas a tratamiento térmico, ya que el detergente SDS permite la extracción de las proteínas desnaturizadas (Arun y Ugur, 2000). Sin embargo, sus principales inconvenientes derivan de la

complejidad de los perfiles proteicos obtenidos y de la necesidad de disponer de personal entrenado e instrumental especializado para realizar los análisis.

- **Isoelectroenfoque (IEF)**

El isoelectroenfoque es una técnica electroforética en un gradiente de pH que permite separar componentes que solamente difieren en 0,01 unidades de pH. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran hacia los diferentes electrodos según su carga eléctrica. La proteína entra en zonas de pH más bajas y más altas de acuerdo con la relación carga neta/curva de pH, por lo que gradualmente va perdiendo su carga neta. Cuando la proteína alcanza su punto isoeléctrico (carga neta cero), cesa su migración y precipita. Por tanto, en la técnica del isoelectroenfoque la separación depende del punto isoeléctrico de la proteína y no de su carga y tamaño.

La técnica de isoelectroenfoque se puede llevar a cabo en geles de agarosa tratada químicamente (*agarosa IEF*). A pesar de tener menor resolución, estos geles permiten identificar especies próximas filogenéticamente y no presentan los inconvenientes de neurotoxicidad, dificultades en la polimerización y largos periodos de desteñido de la acrilamida (Santín y Centrich, 1997).

El isoelectroenfoque se ha utilizado ampliamente en la identificación de numerosas especies animales en los alimentos (Skarpeid y col., 1998). Su gran poder de resolución ha facilitado su aplicación tanto en productos frescos, como en aquéllos sometidos a distintos tratamientos tecnológicos.

Slattery y Sinclair (1983) emplearon con éxito el isoelectroenfoque para diferenciar carnes frescas procedentes de distintas especies animales como vaca, búfalo y canguro. Sin embargo, no pudieron diferenciar carnes procedentes de otras especies estrechamente relacionadas como oveja y cabra, o caballo y burro.

King (1984) utilizó esta técnica para identificar una amplia gama de carnes cocinadas de diferentes especies animales (canguro, camello, búfalo, etc.).

McCormick y col. (1988, 1992) consiguieron diferenciar por isoelectroenfoque ciertas especies de caza mayor (ciervo, caribú, alce y antílope) y domésticas (vaca, oveja, cabra y cerdo) (*Figura 11*). Sin embargo, no fue posible la diferenciación de algunas de las especies analizadas, como vaca y alce (*Figura 11b*) (McCormick y col., 1992).

Jemmi y Schlosser (1991, 1993) trataron de identificar mediante esta técnica algunas especies de rumiantes (vaca, corzo, ciervo, rebeco y gacela) en carnes y mezclas cárnicas tratadas térmicamente y marinadas. La diferenciación de estas especies no siempre fue posible ya que no obtuvieron patrones de bandas de proteínas específicos para cada una de ellas.

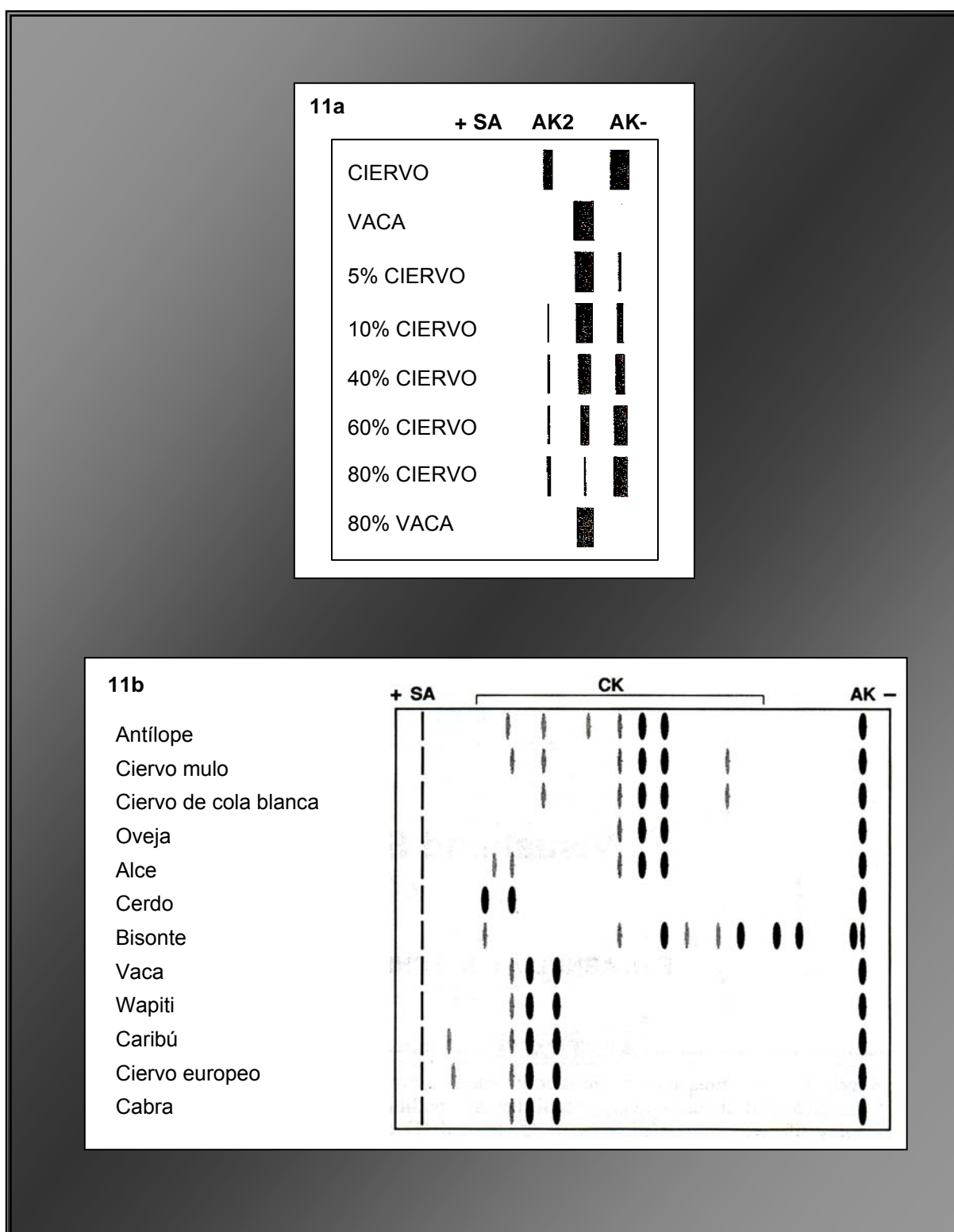


Figura 11. Representación de los perfiles electroforéticos obtenidos por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida a partir de los extractos musculares solubles de **(11a)** salchichas y **(11b)** carnes tratadas térmicamente procedentes de especies de caza mayor y domésticas. AK, AK2: Adenilato kinasas. CK: creatinin kinasa. (SA) Punto de aplicación de la muestra, (+) ánodo y (-) cátodo (McCormick y col., 1988, 1992).

Hofmann (1997) consiguió identificar mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIF) patrones de bandas especie-específicos de la mioglobina en carne de camello, corzo, vaca, oveja, cerdo, caballo, liebre, conejo, avestruz, pollo y pato. No obstante, no fue capaz de discriminar entre cerdo y jabalí o corzo y gamo, debido a la elevada analogía de los patrones obtenidos.

Renon y col. (2003) desarrollaron una técnica de isoelectroenfoque para identificar muestras cárnicas de ciervo, corzo y rebeco.

En comparación con otras técnicas electroforéticas, el IEF presenta numerosas ventajas: (a) es más sencilla y la resolución de los perfiles proteicos es mayor; (b) la técnica se puede modificar en muchos aspectos ajustándose a los requerimientos analíticos que se necesiten; (c) al final de la electroforesis el sistema está en equilibrio y, por tanto, variaciones en los parámetros experimentales influyen menos en el patrón proteico obtenido. Ello permite utilizar fotografías para comparar los patrones de bandas de las muestras problema con muestras de referencia; y (d) la utilización de geles preparados comercialmente, en el caso de los de poliacrilamida, acoplados a aparatos semiautomatizados como el *PhastSystem*TM, permite incluso una mayor reproducibilidad en los resultados, así como una disminución en el tiempo requerido para cada análisis. No obstante, se trata de una técnica laboriosa que requiere operarios especializados e instrumental adecuado. Además, la interpretación de los perfiles proteicos resulta, en algunos casos, complicada.

- ***Electroforesis capilar (EC)***

La electroforesis capilar es otra técnica electroforética que también se ha aplicado a la diferenciación de especies animales en los alimentos (Vallejo y col., 2005). Este método es una modificación de la electroforesis convencional que se basa en separar moléculas con idéntico cociente carga/masa y diferentes masas, sometiénolas a un campo eléctrico en el interior de un tubo capilar de sílice que tiene de 50 a 150 μm de diámetro. Las ventajas que presenta con respecto a otras técnicas electroforéticas es que permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas realizando un análisis completamente automatizado de proteínas sin necesidad de operarios especializados. Esto se debe a que el equipo está dotado de un sistema que elimina el tampón de relleno de la columna y lo reemplaza por otro de forma automática, permitiendo analizar los diferentes componentes de una muestra sin tener que aumentar el número de manipuladores. Además, la técnica de EC posee una elevada resolución, es rápida (10-20 minutos) y requiere pequeños volúmenes, tanto de muestra como de tampón. Su principal limitación reside, sin embargo, en la necesidad de poner a punto sistemas de detección adecuados para cada compuesto que, además, han de ser muy sensibles debido a los pequeños volúmenes que se utilizan. En el caso de las proteínas, se emplean normalmente sistemas de detección ultravioleta (UV) (Recio y col., 2001). Existen distintos tipos de EC, pero la más

utilizada es la electroforesis capilar de zona (ECZ), que utiliza reactivos de amplio intervalo de pH para separar los distintos componentes en una muestra (Kvasnicka, 2005).

Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba (1997) describen cómo el análisis mediante ECZ de la fracción sarcoplásmica de las proteínas del músculo permite la identificación de carnes de distintas especies de animales de abasto, tanto frescas como congeladas, gracias a la obtención de perfiles especie-específicos. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que empleen esta técnica para identificar especies de caza mayor.

II.3.1.2. Técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las técnicas cromatográficas también se han aplicado a la identificación de especies animales en productos cárnicos. Entre ellas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando columnas de fase reversa (RP-HPLC) es la más utilizada. Esta técnica permite la separación de las proteínas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz (Ashoor y col., 1988). De este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie, que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia.

La técnica de HPLC presenta ventajas importantes frente a las técnicas electroforéticas: es un método rápido y sencillo, tiene gran poder de resolución y no emplea reactivos tóxicos. Además, dada su gran reproducibilidad, una vez obtenidos los cromatogramas no es necesario el análisis conjunto de muestras de referencia. El uso de esta técnica es especialmente interesante desde el punto de vista de la cuantificación, ya que los sistemas de detección (generalmente con luz UV) permiten estimar la cantidad de proteína perteneciente a una especie presente en una mezcla. Sin embargo, el gran inconveniente de las técnicas de HPLC es la dificultad para la identificación de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos, ya que las proteínas, una vez desnaturalizadas por el calor, no son solubles en los tampones de elución (Toorop y col., 1997).

Abe y Okuma (1995) obtuvieron patrones de dipéptidos de histidina característicos de especie en carnes tratadas térmicamente procedentes de vaca, cerdo, pollo, pavo, caballo y ciervo.

Espinoza y col. (1996) identificaron y cuantificaron alrededor de 50 especies animales diferentes que incluían un elevado número de cérvidos y otras especies de caza mediante RP-HPLC de la hemoglobina sanguínea.

Toorop y col. (1997) identificaron carnes frescas, congeladas y cocinadas procedentes de diferentes especies de abasto mediante HPLC empleando proteínas miofibrilares. Los patrones proteicos obtenidos fueron reproducibles y permitieron la identificación de las distintas especies.

Chou y col. (2007) desarrollaron una técnica de HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC) para identificar carnes de 15 especies animales. Entre las especies analizadas se incluían mamíferos (vaca, cabra, cerdo, ciervo, caballo), aves (pollo, pato, avestruz) y pescados y marisco (salmón, bacalao, viera, gamba, cangrejo). Estos autores consiguieron obtener perfiles proteicos especie-específicos para todas las especies analizadas (*Figura 12*).

II.3.1.3. Técnicas espectroscópicas

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Actualmente, la espectroscopia proporciona toda una gama de técnicas de identificación de compuestos de acuerdo a sus características espectrales específicas (Kulmyrzaev y col., 2007). En particular, la espectroscopia infrarroja (espectroscopia IR) trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético y se clasifica, según el tipo de la radiación que se analiza, en: espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIR), espectroscopia de reflectancia del infrarrojo medio (MID) y espectroscopia de reflectancia del infrarrojo lejano (FIR). Hoy día, la más empleada en el análisis de alimentos es la NIR, ya que ofrece una amplia información de la calidad y composición química y/o nutritiva de los mismos (Núñez y De la Haba, 2007; Huang y col., 2008).

La espectroscopia NIR obtiene el espectro de reflectancia de una muestra en la región de longitudes de onda comprendidas entre 780-2500 nm. La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de *Lambert-Beer*, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación. Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano sea la combinación de bandas de absorciones parciales que se representan en un gráfico (*Figura 13*) (Cozzolino y col., 2002).

Las razones que justifican que la técnica de NIR esté siendo adoptada como método analítico de elección en numerosos laboratorios son su rapidez, precisión y versatilidad, ya que un mismo instrumento es válido para el análisis de diferentes parámetros en distintos productos con una mínima preparación de la muestra. Además, la técnica de NIR ofrece la posibilidad de realizar análisis cuantitativos y cualitativos para identificar y caracterizar diferentes productos sin la necesidad de emplearse reactivos químicos. Por otra parte, hay que señalar que requiere el manejo de equipos complejos que precisan análisis de calibración exhaustivos (Luykx y Van Ruth, 2008). Además de otras aplicaciones, la espectroscopia NIR se emplea cada vez más para la identificación de especies animales en los alimentos (Cozzolino y col., 2002; Núñez y De la Haba, 2007) y piensos (Pérez-Marín y col., 2004; Termes y col., 2004; Yang y col., 2008).

Al-Jowder y col. (1997) identificaron y cuantificaron la presencia de carne de pollo, pavo y cerdo en carnes y mezclas cárnicas mediante espectroscopia del infrarrojo medio. Asimismo,

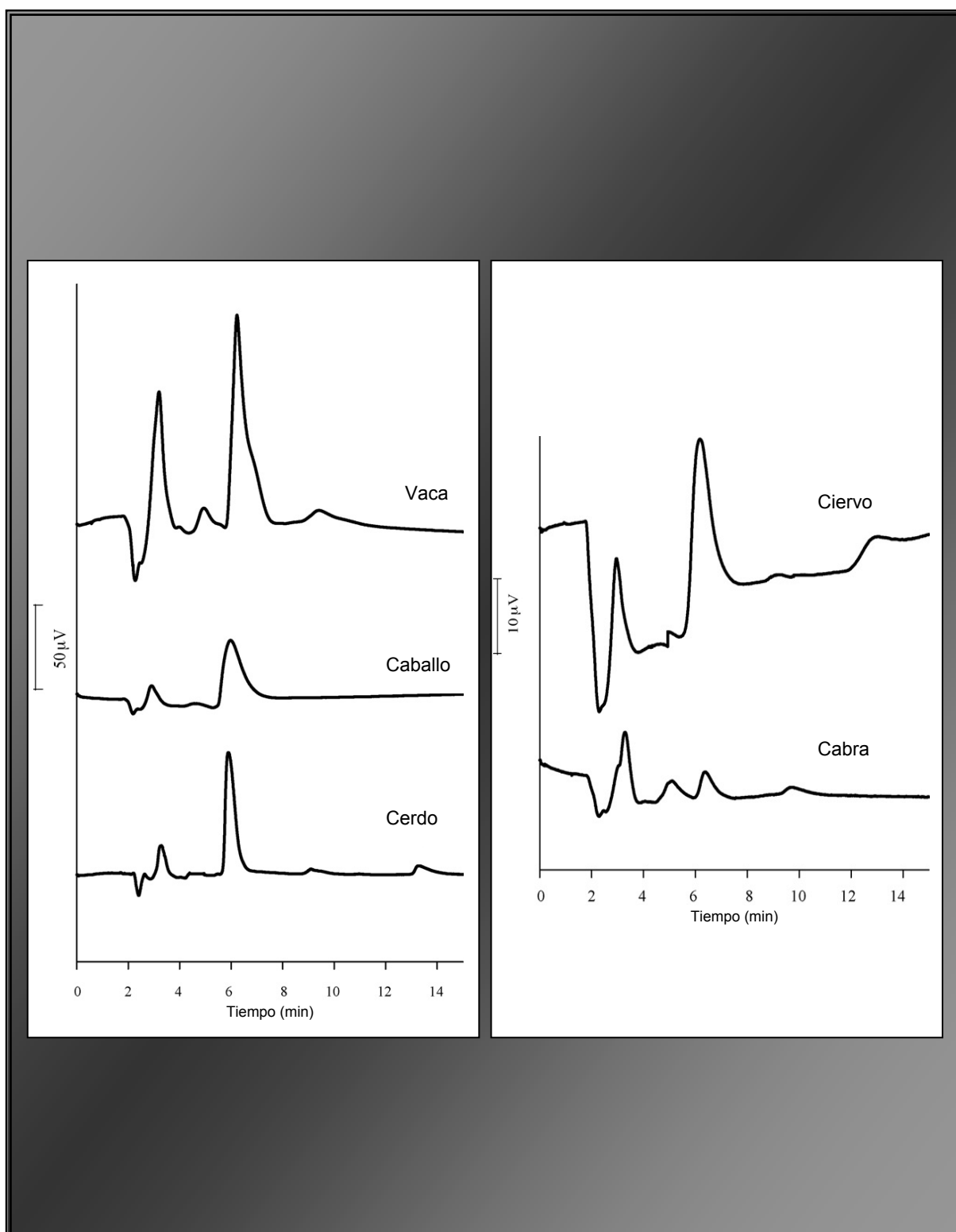


Figura 12. Cromatogramas HPLC-EC obtenidos en varias especies animales (Chou y col., 2007).

lograron diferenciar entre carnes frescas y congeladas.

Ding y Xu (1999) emplearon la tecnología NIR para diferenciar carne picada de vaca y canguro.

McElhinney y col. (1999) consiguieron detectar carne de oveja y vaca en mezclas cárnicas gracias al empleo de diferentes técnicas espectroscópicas (MID y NIR).

Downey y col. (2000) desarrollaron con éxito diferentes técnicas espectroscópicas (NIR, MID y rango visible) para identificar la presencia de pollo, pavo, cerdo, vaca y oveja en muestras de carne cruda.

Cozzolino y col. (2002) demostraron la utilidad de la tecnología NIR para detectar la presencia de materias primas de origen animal tras el análisis de 400 muestras de piensos.

Ellis y col. (2005) consiguieron identificar y diferenciar carnes de pollo y pavo mediante dos técnicas espectroscópicas: la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR/HATR) y la espectroscopia de Raman.

Garrido-Varo y col. (2005), De la Haba y col. (2007) y De la Roza-Delgado y col. (2007), lograron detectar y cuantificar materiales de origen animal (bovino, porcino, etc.) en piensos y harinas animales.



Figura 13. Equipo de espectroscopia de reflectancia de infrarrojo cercano (NIR).

II.3.1.4. Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. La aplicación cada vez más generalizada de estas técnicas para la detección en los alimentos de constituyentes naturales, plaguicidas, microorganismos, toxinas, etc., se debe a las grandes ventajas que presentan frente a los métodos convencionales. En este sentido, la aplicación de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies presenta importantes ventajas con respecto a las electroforéticas y de HPLC: reducción del tiempo y coste del análisis, disminución de la cantidad de muestra necesaria, utilización de instrumental poco complejo y posibilidad de semi-automatización y aplicación en pruebas de campo y kits miniaturizados. Además, su adecuada sensibilidad y especificidad las hacen especialmente útiles para el análisis rutinario de los alimentos. En lo que se refiere a la identificación de especies animales, las técnicas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en el análisis de productos cárnicos (Martín y col., 1988a, 1988b, 1989; Hernández y col., 1994; Smith, 1995; Hsieh y col., 1998; Macedo-Silva y col., 2000), lácteos (Moatsou y Anifantakis, 2003; Hurley y col., 2004) y pesqueros (Asensio y col., 2003; Faeste y Plassen, 2008).

Entre los ensayos inmunológicos más empleados en la identificación de especies animales destacan la inmunodifusión en geles de agar, la inmunoelectroforesis y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

- **Inmunodifusión en geles de agar**

En esta técnica, antígeno y antisuero se depositan en unos pocillos cortados en un gel de agar. Ambos reactivos difunden a través del gel y, en caso de correspondencia, forman en su recorrido complejos antígeno-anticuerpo que se visualizan como líneas blancas y opacas de precipitado.

En la inmunodifusión en geles de agar los reactivos se pueden inmovilizar en discos de papel de filtro, de modo que todos los componentes de la reacción (placas de agar, plantilla, discos de inmunosuero y de referencia) se pueden suministrar en forma de *kit*. La realización de la prueba e interpretación de los resultados es muy sencilla.

Swart y Wilks (1983) utilizaron dicha técnica para identificar especies como vaca, oveja, caballo y canguro en carnes frescas y congeladas, en el intervalo comprendido entre el 5-20%.

Kangethe y col. (1986) consiguieron identificar mediante inmunodifusión en geles de agar 14 especies de la familia de los bóvidos en carnes y productos cárnicos frescos, cocinados y enlatados utilizando un inmunosuero frente a antígenos musculares termoestables.

Cutrufelli y col. (1992, 1993) desarrollaron dos pruebas de campo (DRIFT y MULTI-SIFT)

basadas en la inmunodifusión en geles de agar, con las que detectaron la presencia de vaca, oveja, cerdo, caballo, pollo y ciervo en distintos productos cárnicos frescos.

Reddy (2001) empleó esta técnica para la identificación de carnes de vaca, cabra, búfalo y oveja. El límite de detección fue del 1% en carnes frescas y del 2-10% en carnes cocinadas.

- **Inmunoelectroforesis**

A pesar de que la inmunodifusión permite obtener una línea de precipitación separada para cada antígeno y anticuerpo que se encuentra en una mezcla, a veces resulta difícil separar todos los componentes de una matriz compleja. La inmunoelectroforesis mejora la resolución del sistema, separando los antígenos por electroforesis antes de llevar a cabo la inmunodifusión.

Casas y col. (1984a, 1984b, 1985) detectaron proteínas solubles de cerdo, vaca y caballo mediante inmunoelectroforesis en geles de agarosa.

Bakshi y col. (1985) emplearon la técnica de inmunoelectroforesis para detectar concentraciones del 10% de cabra, camello, búfalo y ciervo en mezclas cárnicas.

Sherikar y col. (1993) compararon diversas técnicas inmunológicas para la identificación de vaca, búfalo, cabra y cerdo en carnes frescas y cocinadas. Concretamente, con la técnica de *counter*-inmunoelectroforesis (CIE) lograron un límite de detección de aproximadamente 5-10%.

Reddy (2001) consiguió detectar la adición de hasta un 1% de vaca, cabra, búfalo y oveja en carnes frescas mediante diversos tipos de inmunoelectroforesis tales como inmunoelectroforesis (IE), *counter*-inmunoelectroforesis (CIE) e inmunoelectroforesis cruzada o *rocket* (RIE). El límite de detección en carnes cocinadas fue del 10-20%.

Necidová y col. (2002) detectaron la adición de porcentajes inferiores al 1,5% de cerdo, vaca, pollo y canguro en productos cárnicos tratados térmicamente.

- **Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)**

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) constituyen en la actualidad los métodos inmunológicos más utilizados en el análisis de alimentos. Se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En la técnica de ELISA, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. En algunos formatos, denominados *immunodotting*, se utilizan como fase sólida membranas de nitrocelulosa a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción antígeno-

anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la acción de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA permite cuantificar la reacción inmunológica. Esto supone una importante ventaja frente a la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis, que son técnicas fundamentalmente cualitativas.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. En la identificación de especies, los más utilizados son el ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA *sandwich* (Asensio y col., 2008).

Las primeras aplicaciones de las técnicas de ELISA para la detección y cuantificación de carnes de diferentes especies animales en mezclas cárnicas se deben a Kangethe y col. (1982) y a Whithaker y col. (1982). En los trabajos publicados por ambos autores, se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos frente a la albúmina sérica de vaca, oveja, caballo, canguro, cerdo y camello y, mediante un ELISA indirecto, se consiguieron niveles de detección del 3% de estas especies en diversas mezclas cárnicas. Para eliminar las reacciones cruzadas, los anticuerpos se neutralizaron con las correspondientes albúminas heterólogas.

Martín y col. (1988a, 1988b, 1988c) lograron detectar cerdo, caballo y pollo en mezclas cárnicas crudas mediante el empleo de anticuerpos policlonales frente a proteínas musculares solubles en una técnica de ELISA *sandwich*. Para todas las especies el límite de detección conseguido fue del 1%.

Andrews y col. (1992) detectaron la presencia de carne de vaca, cordero, caballo y ciervo en productos cárnicos cocinados utilizando una técnica de ELISA *sandwich* con anticuerpos policlonales específicos de especie.

Hsieh y col. (1995) identificaron pollo y oveja en muestras frescas, así como vaca, oveja, cerdo y caballo en productos cárnicos curados empleando una técnica de ELISA *sandwich*. El límite de detección alcanzado fue del 1%.

Rencová y col. (2000) detectaron la presencia de pollo, caballo, canguro y rata en productos cárnicos procesados mediante una técnica de ELISA indirecto competitivo y anticuerpos policlonales frente a proteínas musculares solubles. El nivel de detección conseguido fue del 1-5%.

A pesar de la utilidad de las técnicas descritas, los anticuerpos policlonales con frecuencia presentan reacciones cruzadas frente a proteínas que son distintas de aquéllas empleadas en su obtención. Por ello, es necesario el uso de técnicas de purificación por cromatografía de afinidad o neutralización para la eliminación de dichas reacciones inespecíficas. Además, dado que para la obtención de los inmunoseros los animales de

experimentación se sacrifican al final de la fase de inmunización, la disponibilidad limitada de anticuerpo a lo largo del tiempo y la gran variabilidad individual en la respuesta inmunológica restringe la aplicación de estas técnicas (Restani y col., 2002). Los inconvenientes inherentes a la utilización de los anticuerpos policlonales pueden solventarse mediante el empleo de anticuerpos monoclonales. La tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975) permite inmortalizar in vitro clones de linfocitos B que producen cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales de especificidad idéntica.

Jones y Patterson (1986) identificaron diferentes especies animales en carne cruda utilizando una técnica de ELISA indirecto.

Martín y col. (1989) lograron detectar carne de pollo y pavo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales especie-específicos frente a proteínas musculares solubles en una técnica de ELISA indirecto.

Sherikar y col. (1993) desarrollaron una técnica de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales frente a la proteína termoestable troponina I y consiguieron detectar vaca, búfalo, oveja, cabra y cerdo en carnes frescas y cocinadas con un límite de detección del 1%.

Hsieh y col. (1998) detectaron la presencia de vaca, cerdo, cordero, caballo y ciervo en productos cárnicos cocinados mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos de proteínas termoestables en un ELISA indirecto. El límite de detección alcanzado fue del 0,5% para todas las especies.

Chen y Hsieh (2000) emplearon anticuerpos monoclonales obtenidos frente a proteínas musculares termoestables de cerdo para identificar la presencia de esta especie en muestras cárnicas tratadas térmicamente.

Macedo-Silva y col. (2000) consiguieron identificar diversas especies de animales de abasto (vaca, pollo, cerdo y caballo) en hamburguesas utilizando la técnica de *immunodotting*. Los anticuerpos monoclonales específicos reconocían proteínas musculares. El límite de detección del ensayo fue del 0,6%.

Zade y col. (2001) identificaron carnes de vaca y búfalo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales frente a proteínas musculares en una técnica de ELISA indirecto. El límite de detección alcanzado fue del 0,5%.

Giovanacci y col. (2004) utilizaron varios *kits* inmunoenzimáticos comerciales preparados con anticuerpos monoclonales frente a proteínas musculares para detectar pequeños porcentajes de cerdo, vaca, oveja y pollo en productos cárnicos intensamente procesados. El límite de detección de los *kits* fue menor del 1% para vaca, cerdo y caballo y menor del 2% para oveja.

Ayaz y col. (2006) detectaron la presencia de vaca, ciervo, caballo o pollo en carne cruda, cocinada y en diferentes productos cárnicos comerciales (salchichas, salami, jamón, bacon, etc.) mediante el empleo de *kits* inmunoenzimáticos. El límite de detección de estos *kits* fue del 1% para muestras enlatadas, cocinadas o procesadas.

II.3.2. TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. A pesar de resultar más costosas y exigir un mayor soporte técnico que las basadas en el análisis de proteínas, las técnicas genéticas presentan importantes ventajas frente a éstas (*Tabla 7*). Conviene destacar que resultan especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos debido a la elevada estabilidad del ADN en dichos procesos (Buntjer y Lenstra, 1998; Colgan y col., 2001; Dalmaso y col., 2004).

Dentro de las técnicas genéticas, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son, sin duda, las más aplicadas al análisis de los alimentos. Entre sus múltiples utilidades cabe destacar la identificación del origen de muchos de los componentes presentes en los alimentos (Girish y col., 2004; Woolfe y Primrose, 2004; Mafra y col., 2008) y la detección y cuantificación de microorganismos patógenos y de interés higiénico-sanitario (Boyapalle y col., 2001; Kimura y col., 2001; González y col., 2006; Takahashi y col., 2008).

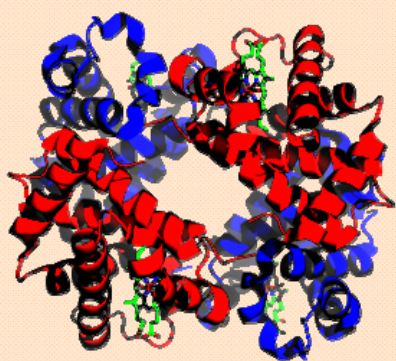
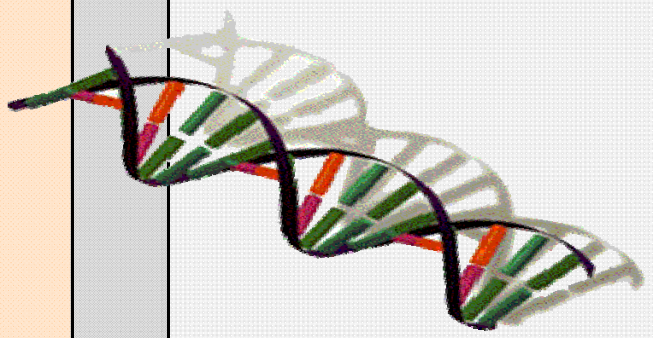
La técnica de PCR se ha utilizado ampliamente para la identificación de especies animales en productos cárnicos, bien de forma directa o asociada a técnicas como la secuenciación (PCR-secuenciación), el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD), el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificado por PCR (PCR-SSCP) o el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) (Girish y col., 2005; Arslan y col., 2005; Kitano y col., 2007; Tobe y col., 2008). Sin embargo, hay que señalar que su aplicación para la identificación de carnes procedentes de especies de caza mayor es inferior al de otras carnes de consumo habitual (Brodmann y col., 2001; Colombo y col., 2004; Maede, 2006).

A continuación se detallan las principales técnicas genéticas aplicadas a la identificación del origen animal de los alimentos.

II.3.2.1. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (PCR-secuenciación)

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un determinado fragmento génico por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permitan diferenciar las especies

Tabla 7. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para la identificación de especies animales

Métodos basados en el análisis de proteínas			
Ventajas	<ul style="list-style-type: none">• Rapidez• Bajo coste• Sencillez• Amplia disponibilidad de datos	Inconvenientes	<ul style="list-style-type: none">• Dificultad para analizar muestras procesadas o tratadas térmicamente• Necesario buen estado de las muestras• Interpretación de resultados compleja• Las proteínas varían (en cantidad y en tipo) dependiendo del tejido que se examine
			
Métodos genéticos			
Ventajas	<ul style="list-style-type: none">• Poca cantidad de muestra• Posibilidad de analizar muestras procesadas y esterilizadas• Detección de mutaciones silentes• El ADN es el mismo en todas las células de un organismo	Inconvenientes	<ul style="list-style-type: none">• Relativamente lentos y caros• Técnicas más complejas• Personal más especializado• Menos información disponible
			

estudiadas.

Para seleccionar adecuadamente la región del genoma que se debe amplificar es preciso tener en cuenta varias premisas (Bartlett y Davidson, 1992):

- Debe acumular mutaciones con la suficiente rapidez como para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias nucleotídicas, pero también con la suficiente lentitud para que la variación intraespecífica no afecte a la diferenciación de especies.
- El tamaño del segmento de ADN ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias en la secuencia entre especies próximas, pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- La existencia en las bases de datos de secuencias del gen seleccionado correspondientes a otros organismos permite comparar dichas secuencias con las generadas en la muestra sometida a análisis.

El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. Bartlett y Davidson (1992) fueron los primeros en introducir un programa basado en la elaboración de árboles filogenéticos, que permite comparar la secuencia de la especie problema con la de otras especies previamente secuenciadas e introducidas en la base de datos. Sin embargo, la gran importancia que está adquiriendo la identificación de especies, ha hecho que se diseñen otros programas informáticos más específicos, basados en la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre secuencias (Forrest y Carnegie, 1994; Meyer y Candrian, 1996).

El gen mitocondrial que codifica el citocromo b ha sido el marcador más utilizado en la identificación de especies animales. Kocher y col. (1989) emplearon los genes mitocondriales que codifican la región control, el citocromo b y el 12S ARNr, para identificar más de cien especies animales entre las que se incluían mamíferos, aves, anfibios, pescados y algunos invertebrados. Las secuencias de estas especies se utilizaron para estudiar las relaciones filogenéticas que existían entre ellas.

Bartlett y Davidson (1992) desarrollaron una técnica de identificación de especies denominada FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*). Básicamente, consiste en la construcción de bases de datos con las secuencias de un fragmento del citocromo b en diferentes especies. Una comparación directa de la secuencia problema con las secuencias patrón permite determinar la especie de procedencia de la muestra. Estos autores aplicaron con éxito la técnica de FINS a la identificación de numerosas especies animales.

Chikuni y col. (1994) utilizaron la técnica de PCR-secuenciación para identificar distintas especies de mamíferos (vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, conejo y ciervo) y aves (pollo,

codorniz, gorrión y zorzal). Para ello, amplificaron un fragmento de 646 pb del gen mitocondrial citocromo b.

Forrest y Carnegie (1994) aplicaron el programa DNADIST con secuencias del gen mitocondrial citocromo b para determinar la relación filogenética existente entre especies de carne como el búfalo o el emú.

Bataille y col. (1999) identificaron especies como vaca, pollo, caballo y cerdo, tras secuenciar un fragmento del gen mitocondrial citocromo b de 309 pb.

Brodmann y col. (2001) consiguieron identificar carne de rebeco, ciervo, gamo, corzo, oveja, pavo, pollo y pato mediante la secuenciación de varias regiones del gen mitocondrial citocromo b. Sin embargo, no fueron capaces de diferenciar carnes procedentes de jabalí y cerdo doméstico debido a que las secuencias obtenidas en ambas subespecies porcinas resultaron idénticas.

Colombo y col. (2004) secuenciaron un fragmento de 282 pb del gen mitocondrial citocromo b para identificar muestras de carne de rebeco.

Girish y col. (2004) aplicaron la técnica de PCR-secuenciación para diferenciar especies como vaca, oveja, cabra y búfala, además de otras especies de mamíferos. El marcador elegido fue un fragmento de 456 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr.

Li y col. (2006) consiguieron diferenciar especies de cérvidos mediante la secuenciación de fragmentos amplificados de los genes mitocondriales citocromo b y 12S ARNr.

Kitano y col. (2007) aplicaron la técnica de PCR-secuenciación para identificar un elevado número de vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces). De forma similar, Karlsson y Holmlund (2007) identificaron con éxito un total de 28 especies de mamíferos, incluyendo algunas de caza como el jabalí y varias especies de cérvidos. Para ello, estos autores emplearon parejas de cebadores conservados que amplificaban fragmentos pequeños en los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr.

Además de los genes mitocondriales, también se han utilizado genes nucleares para la diferenciación de especies mediante PCR-secuenciación. Bucher y col. (1996) amplificaron un fragmento de 1.339 pb del gen p53, cuya secuenciación permitió la identificación específica de ADN de caballo.

Venkatachalapathy y col. (2008) han conseguido caracterizar en búfalo la secuencia del gen DGAT1 de 1470 pb, situado en el cromosoma 14.

A pesar de los últimos avances producidos en los equipos y metodologías, la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR sigue siendo una herramienta analítica relativamente costosa como técnica de análisis rutinaria (Brodmann y col., 2001).

II.3.2.2. Análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas del ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP)

La técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de ADN monocatenario (ADNmc) y su conformación, que en definitiva es un reflejo de su secuencia nucleotídica (Orita y col. 1989a, 1989b; Lockley y Bardsley, 2000a). En la técnica de PCR-SSCP, el ADN bicatenario (ADNbc) se desnaturaliza a ADN monocatenario (ADNmc) y, posteriormente, se separan las dos hebras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes. Cualquier diferencia en la secuencia de ADNmc se visualizará al final del proceso.

La técnica de PCR-SSCP se ha utilizado con éxito en un gran número de aplicaciones, la mayoría de ellas dentro del ámbito de la medicina (Glavac y Dean, 1993; Huang y col., 2008). Así, su primer campo de aplicación ha sido el diagnóstico de alteraciones genéticas en ciertas enfermedades humanas (Dean y col., 1990; Kim y col., 2008; Konstantinos y col., 2008), ya que permite detectar mutaciones puntuales en los productos amplificados por PCR.

La aplicación de este método genético al análisis de los alimentos es, sin embargo, relativamente reciente. La técnica de PCR-SSCP se ha utilizado, sobre todo, para identificar microorganismos patógenos y de utilidad tecnológica (Hein y col., 2003; Oh y col., 2008; Takahashi y col., 2008), así como para estudiar la evolución y diversidad génica de diferentes poblaciones animales (Travis y Keim, 1995; Guo y col., 2005; Zhou y col., 2005; Álvarez-Busto y col., 2007).

Además, la técnica de PCR-SSCP se ha utilizado para la identificación de diferentes especies animales (Marklund y col., 1995; Rea y col., 1996; Plath y col., 1997; Otaviano y col., 2005; Ripoli y col., 2006; Rasmussen y col., 2008). El marcador mitocondrial más utilizado ha sido la región control, especialmente la zona D-loop, ya que posee una elevada tasa de evolución debido a sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos (Takeda y col., 1995; Eledath y Hines, 1996).

Entre los escasos trabajos que describen la aplicación de la técnica de PCR-SSCP a la identificación de especies de caza mayor, cabe citar el de Rea y col. (1996), que trataron de discriminar muestras de jabalí y de cerdo doméstico en diferentes zonas de la región D-loop. Estos autores no consiguieron obtener patrones especie-específicos que permitieran la diferenciación entre estas dos subespecies porcinas.

La técnica de PCR-SSCP presenta importantes ventajas en la identificación de especies animales: (a) se pueden analizar fragmentos de ADN pequeños, procedentes de muestras degradadas durante el procesado (Tartaglia y col., 1998); (b) permite detectar cualquier diferencia en una sola base, lo cual supone una ventaja frente a la técnica de PCR-RFLP que está condicionada por la existencia de enzimas de restricción que tengan su diana en el lugar de

la mutación (Ripoli y col., 2006); (c) su gran poder de detección de mutaciones la hace también muy adecuada para la identificación de especies muy próximas, en las que se pueden encontrar muy pocas diferencias en las secuencias (Barroso y col., 1998); y (d) los perfiles de bandas de ADN que se obtienen son sencillos de interpretar debido al reducido número de bandas que presentan.

A pesar de estas ventajas, no existe una teoría capaz de explicar y predecir la conformación de las moléculas de ADNmc con relación a su secuencia, o la movilidad de dichas moléculas en función de su conformación. La técnica de PCR-SSCP es, por tanto, una técnica bastante empírica (Rea y col., 1996). En este sentido, se han llevado a cabo diversos trabajos que estudian las condiciones que afectan a la proporción de mutaciones detectadas mediante SSCP: temperatura, concentración del gel, proporción acrilamida/bisacrilamida, tipo de solución desnaturizante empleada, adición de distintos compuestos al gel, etc. (Glavac y Dean, 1993; Fujita y Silver, 1994). Los resultados de estos trabajos, aunque válidos en las secuencias estudiadas, no son extrapolables a otros fragmentos. Por tanto, la obtención de resultados reproducibles estará condicionada por el desarrollo de la técnica bajo condiciones controladas, siendo además muy importante la utilización de patrones de muestras de referencia.

II.3.2.3. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), denominada también AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), fue descrita por dos grupos de investigadores en 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos del ADN mediante PCR, utilizando para ello un único cebador (normalmente de 9-15 bases) cuya secuencia se escoge al azar. Las temperaturas de unión (T_a) empleadas en la técnica de RAPD son mucho más bajas que en una PCR convencional (35-39 °C), lo cual favorece la inespecificidad de la reacción. Los fragmentos amplificados se analizan normalmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, aunque si se quiere obtener mayor resolución, se pueden analizar utilizando geles de poliacrilamida y tinción con plata (Bowditch y col., 1993). El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN, se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador y se haga el análisis en las mismas condiciones. De este modo, los perfiles obtenidos mediante RAPD pueden permitir la diferenciación de los ADNs a nivel de especie, o incluso a nivel de individuo.

Esta técnica, al igual que otras técnicas genéticas, ha tenido una gran aceptación en el campo del análisis de los alimentos, si bien su aplicación ha sido relativamente reciente. En este sentido, se ha utilizado sobre todo para la identificación y caracterización taxonómica de microorganismos (Edwards y col., 2002; Seseña y col., 2005; Krízová y col., 2008), y para la identificación de especies en productos vegetales (Weder, 2002; Konisho y col., 2005; Koveza y

col., 2005), cárnicos (Koh y col., 1998; Martínez e Yman, 1998; Sáez y col., 2004; Arslan y col., 2005) y pesqueros (Ali y col., 2004; Ramella y col., 2005; Mohindra y col., 2007).

Comincini y col. (1996) consiguieron identificar y establecer las relaciones filogenéticas existentes entre diferentes especies de cérvidos mediante los perfiles de bandas de ADN obtenidos por RAPD, empleando ocho cebadores de tamaños comprendidos entre 19 y 26 pares de bases.

Koh y col. (1998) abordaron la identificación de carnes de jabalí, ciervo, caballo, búfalo, canguro y otras especies domésticas mediante PCR-RAPD. Para ello, utilizaron 29 cebadores de 10 nucleótidos de longitud.

Martínez e Yman (1998) realizaron un amplio estudio de identificación mediante RAPD que incluía 12 especies animales de interés comercial (vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, alce, canguro, avestruz, etc.). Estos autores obtuvieron perfiles específicos para cada una de ellas, tanto en muestras frescas como en muestras congeladas y enlatadas.

Sáez y col. (2004) obtuvieron diferentes perfiles de bandas de ADN que permitieron la diferenciación de cerdo, vaca, cordero, pollo y pavo en productos cárnicos, utilizando la técnica de RAPD.

Arslan y col. (2005) consiguieron identificar mediante esta técnica varias especies animales (vaca, oveja, cabra, camello, cerdo, burro, etc.) en carne y mezclas cárnicas frescas. Para ello, utilizaron un único cebador de 10 nucleótidos de longitud.

Wu y col. (2006) utilizaron la técnica de RAPD para identificar y diferenciar especies pertenecientes a la familia *Cervidae*.

La identificación de especies animales mediante RAPD presenta importantes ventajas: (a) no es necesario conocer previamente las secuencias de ADN que se pretenden amplificar, ya que el diseño del cebador es arbitrario (Martínez y Danielsdóttir, 2000); (b) se necesita muy poca cantidad de muestra; (c) permite examinar un gran número de polimorfismos en el ADN: esto resulta muy importante en la identificación de especies íntimamente relacionadas (Comincini y col., 1996), o en especies que presentan un bajo nivel de variabilidad genética; y (d) es una técnica sencilla, rápida y barata, ya que no requiere el uso de ningún aparato especial.

El principal inconveniente de la técnica de RAPD reside en la dificultad de obtener resultados reproducibles, por lo que la amplificación ha de desarrollarse bajo condiciones estrictamente controladas y estandarizadas. Cualquier modificación en la temperatura, número de ciclos, concentración de reactivos, o incluso en el aparato utilizado, puede alterar los perfiles obtenidos. Es, además, especialmente importante que el ADN de partida no esté muy degradado, ya que de lo contrario los resultados no serán reproducibles (Martínez e Yman, 1998). La utilización de patrones de muestras conocidas es, por tanto, necesaria para poder

comparar los resultados con las muestras analizadas (Koh y col., 1998).

Por otro lado, la necesidad de utilizar ADN de cierta calidad para obtener perfiles reproducibles mediante RAPD dificulta la aplicación de esta técnica a la identificación de especies en muestras sometidas a tratamientos térmicos, ya que en la mayoría de ellas el ADN se encuentra degradado (Unsel y col., 1995; Martínez y Yman, 1998). Otra limitación de la técnica de RAPD, debida en este caso a la inespecificidad de la propia reacción de amplificación, es que no permite identificar el ADN de un determinado organismo en mezclas complejas de ADN, lo que limita su aplicación al análisis de alimentos que contienen más de una especie (Martínez y Daníelsdóttir, 2000).

II.3.2.4. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP)

La técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR y su posterior tratamiento con enzimas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños. Las diferencias existentes en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis (Fajardo y col., 2006, 2007).

En la técnica de PCR-RFLP, la elección de las endonucleasas de restricción puede hacerse al azar, o estar basada en el conocimiento y comparación previos de las secuencias del fragmento analizado (empleando por ejemplo, las secuencias disponibles en las bases de datos). En cualquier caso, es imprescindible seleccionar enzimas que no generen variaciones intraespecíficas, lo cual se comprueba mediante el análisis de un número adecuado de muestras. Además, la eficacia de la técnica de PCR-RFLP va a depender del grado de variabilidad genética de la secuencia elegida, así como de su tamaño. Ambos parámetros han de permitir la detección de variaciones interespecíficas, pero no intraespecíficas.

Para la identificación de especies mediante PCR-RFLP, con frecuencia se seleccionan zonas conservadas y fragmentos pequeños. Los genes mitocondriales, y principalmente el gen que codifica el citocromo b, han sido ampliamente utilizados para la identificación de numerosas especies animales, debido a que contienen suficiente variabilidad interespecífica para producir perfiles de restricción específicos de especie (Partis y col., 2000; Pfeiffer y col., 2004).

La técnica de PCR-RFLP se ha utilizado con éxito para la identificación de especies animales en carnes y productos cárnicos (Verkaar y col., 2002; Sun y Lin, 2003; Girish y col., 2005; Maede, 2006). Concretamente, esta técnica se ha empleado para la identificación de algunas especies de caza mayor. Por ejemplo, Meyer y col. (1995) identificaron carnes marinadas y tratadas térmicamente de ciervo, corzo, alce, antílope, rebeco, muflón, jabalí, canguro, vaca, cabra, oveja, búfalo, cerdo, caballo, pollo y pavo, mediante la digestión con una

combinación de 20 enzimas de restricción de un fragmento de 359 pb amplificado en el gen mitocondrial citocromo b.

Murray y col. (1995) utilizaron la región mitocondrial D-loop y un elevado número de enzimas de restricción para la identificación específica de antílope, caribú, “wapiti”, muflón, bisonte, cabra y vaca. No obstante, no consiguieron la diferenciación entre algunas de las especies de cérvidos analizadas.

Matsunaga y col. (1998) diferenciaron carnes procedentes de especies de la familia *Cervidae* mediante la digestión enzimática con *EcoRI*, *BamHI* y *SalI* de un fragmento específico de cérvidos de 194 pb amplificado en el gen mitocondrial citocromo b.

Zimmerman y col. (1998) desarrollaron una técnica de PCR-RFLP para identificar ciervo, gamo, corzo, bisonte y liebre en mezclas cárnicas mediante la amplificación de un fragmento conservado de 981 pb del gen mitocondrial citocromo b, seguida de la restricción con las endonucleasas *AluI* y *NcoI*.

Wolf y col. (1999) aplicaron esta técnica para detectar e identificar carnes procedentes de ciervo, gamo, alce, antílope, gacela, ñú, rebeco, cabra alpina, canguro, vaca, cabra, oveja, búfalo y liebre, utilizando el gen mitocondrial citocromo b y 11 enzimas de restricción. No obstante, no consiguieron diferenciar jabalí de cerdo doméstico, ni muflón de oveja.

Montiel-Sosa y col. (2000) llevaron a cabo la identificación y diferenciación de carnes (frescas, curadas y tratadas térmicamente) procedentes de jabalí y cerdo doméstico, gracias a la digestión con la enzima *AvaI* de un fragmento específico de 531 pb amplificado en la región mitocondrial D-loop. Posteriormente, Krkoska y col. (2003) demostraron que los resultados obtenidos por Montiel-Sosa y col. (2000) no se reproducían tras analizar un elevado número de muestras de jabalí y cerdo doméstico, debido a la presencia de polimorfismos intraespecíficos. No obstante, Krkoska y col. (2003) lograron identificar correctamente el 90% de las muestras analizadas de jabalí y cerdo en el fragmento específico de 531 pb de la región D-loop gracias a los perfiles de restricción obtenidos con la enzima *Tsp509I*.

Pascoal y col. (2004) realizaron un estudio de mercado con diversos productos cárnicos (frescos, curados, esterilizados, ahumados, precocinados y congelados) procedentes de especies de caza mayor, utilizando las enzimas de restricción *PstI*, *MboI*, *HinfI* y *AluI* en una técnica de PCR-RFLP. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de un nivel elevado de fraudes de sustitución, ya que detectaron ADNs de especies animales distintas de las que se indicaban en el etiquetado de los productos analizados.

Pfeiffer y col. (2004) también aplicaron con éxito la técnica de PCR-RFLP en el gen citocromo b para identificar ciervo, corzo y especies domésticas.

Maede (2006) empleó cebadores específicos de cérvidos, aves, bovinos, porcinos y equinos y 8 enzimas de restricción distintas para la autenticación de carne y productos cárnicos mediante PCR-RFLP. Además, este autor verificó los resultados obtenidos mediante una técnica de PCR-secuenciación.

Park y col. (2007) desarrollaron una técnica de PCR-RFLP para identificar carnes de ciervo, vaca, cerdo, caballo, pollo, pato y pavo, utilizando un fragmento conservado de 455 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr y las enzimas *Tsp509I* y *Mbol*.

La técnica de PCR-RFLP es sencilla, rápida, y no requiere el uso de instrumental complejo. Por ello, resulta muy apropiada para análisis rutinarios en laboratorios de control de calidad de alimentos (Branciarì y col., 2000). Hoy día, una de las técnicas más prometedoras aplicadas a la identificación de especies animales es la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip*, que adapta la metodología convencional de electroforesis capilar a un formato de chip miniaturizado de un sólo uso (*LabChip*). El soporte *LabChip* lleva incorporados una serie de capilares directamente unidos a los pocillos donde se depositan las muestras. Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones enzimáticas se separan por electroforesis capilar y los perfiles de restricción generados se detectan en un analizador de fluorescencia gracias a una sonda marcada que hibrida con el ADN y un láser que induce la fluorescencia (Dooley y col., 2005a, b).

El Bioanalizador *Agilent 2100* (Agilent Technologies Ltd., South Queensferry, UK) fue el primer instrumento disponible comercialmente en el uso de la tecnología de microfluidos para análisis de muestras biológicas (*Figura 14*). Este equipo abarca un amplio campo de aplicaciones en un único sistema compacto, permitiendo la realización de análisis de proteínas, DNA, RNA y células. Para ello, existen diferentes tipos de *kits* que incluyen reactivos y chips específicos para cada tipo de muestras. Actualmente, este dispositivo está reemplazando el empleo de la electroforesis en gel, ya que ha demostrado ser una alternativa más limpia, rápida y menos laboriosa (Panaro y col., 2000; Gottwald y col., 2001).

La miniaturización de la instrumentación analítica tiene como ventajas sobre las técnicas convencionales: la mejora de la reproducibilidad y precisión de datos, tiempos de análisis más cortos, gran versatilidad, sencillez, un mínimo consumo de muestra y posibilidad de automatización debido a que proporciona datos digitales fáciles de analizar, interpretar y almacenar gracias al *software* Experto que incluye (Nachamkin y col., 2001).

La tecnología *lab-on-a-chip* se ha empleado en la industria alimentaria para identificar especies animales (Dooley y Garret, 2001; Dooley y col., 2005a, b) y vegetales (Dooley y col., 2003; Spaniolas y col., 2006), así como para detectar e identificar microorganismos patógenos y de interés tecnológico (Hierro y col., 2004; González y col., 2006) y organismos modificados genéticamente (OMG) (McDowell y col., 2001; Peano y col., 2005; Lee y col., 2007). Hasta el

momento, no se conocen trabajos publicados sobre identificación genética de especies animales de caza mayor mediante la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip*.

II.3.2.5. PCR con cebadores específicos

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas en las técnicas de PCR aplicadas a la identificación de especies, consiste en el diseño de cebadores específicos para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN a partir de diferentes organismos. Así, la técnica de PCR con cebadores específicos se ha utilizado para la autenticación de productos de origen animal como la leche y productos lácteos (De la Fuente y Juárez, 2005; Mayer, 2005; López-Calleja 2005a, b), pescado (Lockley y Bardsley, 2000b; Sezaki y col., 2005) y carne y productos cárnicos (Calvo y col., 2001; Lockley y Bardsley, 2002; Rodríguez y col., 2004; Di Pinto y col., 2005). No obstante, como ya se ha señalado, la aplicación de esta técnica para la identificación de especies de caza mayor está menos generalizada (Rajapaksha y col., 2002; Fajardo y col., 2007).

Meyer y col. (1994) aplicaron una técnica de PCR con cebadores específicos para identificar la presencia de carne de cerdo en productos cárnicos tratados por calor. Para ello, amplificaron un fragmento específico de 108 pb del gen nuclear que codifica para la hormona de crecimiento (GH) a partir de ADN porcino. El límite de detección del ensayo fue de



Figura 14. Equipo de tecnología *lab-on-a-chip* Bioanalizador Agilent 2100.

aproximadamente el 1%.

Matsunaga y col. (1999) emplearon una técnica de PCR múltiple para la identificación simultánea de carnes de cabra, pollo, vaca, oveja, cerdo y caballo en productos tratados por calor, mediante la amplificación de fragmentos específicos de especie en el gen mitocondrial citocromo b.

Herman (2001) utilizó la técnica de PCR con cebadores específicos diseñados en el gen mitocondrial citocromo b para identificar vaca, oveja, cerdo, pollo y pavo.

Rajapaksha y col. (2002) amplificaron mediante PCR un fragmento específico de aproximadamente 450 pb en la región del citocromo b para diferenciar carne de cérvidos de especies domésticas como vaca, cabra, búfalo, cerdo y oveja.

Myers y col. (2003) detectaron la presencia de vaca, oveja, cabra, ciervo y alce en piensos animales mediante la amplificación por PCR de un fragmento conservado de ADN mitocondrial de 271 pb situado entre la subunidad citocromo oxidasa II y la tRNA-lisina.

Rodríguez y col. (2004) desarrollaron una técnica de PCR empleando el gen mitocondrial 12S ARNr para la identificación de vaca, oveja, cabra y cerdo en mezclas cárnicas mediante la amplificación de fragmentos específicos de especie. El límite de detección alcanzado fue del 1% para todas las especies analizadas, tanto en mezclas cárnicas frescas como tratadas térmicamente.

Ha y col. (2006) detectaron la presencia de ADN de ciervo, vaca, oveja y cabra en piensos mediante el empleo de cebadores especie-específicos diseñados en los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr. El nivel de contaminación detectado con tejido animal procedente de estas especies en productos vegetales y piensos fue del 0,05%.

Kesmen y col. (2007) emplearon las dos subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8) y de la NADH deshidrogenasa en una técnica de PCR para la detección específica de cerdo, caballo y burro en salchichas cocidas, mediante la amplificación específica de tres fragmentos de 227, 153 y 145 pb, respectivamente. El límite de detección del ensayo fue del 0,1%.

Tobe y col. (2008) emplearon una técnica de PCR con cebadores específicos para la identificación de 18 especies de mamíferos (ciervo, oveja, cabra, cerdo, caballo, burro, etc.) en el gen mitocondrial citocromo b.

A pesar de su simplicidad, la identificación de especies animales en los alimentos mediante PCR, sin el apoyo de ninguna otra técnica complementaria, presenta el inconveniente de que es necesario conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. En la actualidad, este proceso es más sencillo gracias a que las bases de datos disponibles son cada

vez más completas. No obstante, en ocasiones la identificación es difícil de llevar a cabo porque hay algunas especies animales de las que no se conoce ninguna secuencia y también, por la dificultad que conlleva el diseño de cebadores que sean específicos para una sola especie (Pascoal y col., 2005; Fajardo y col., 2007).

II.3.2.6. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico

Todas las técnicas genéticas expuestas se basan en la identificación de especies mediante la detección de diferencias de la secuencia nucleotídica de sus respectivos ADNs. En el ADN nuclear existe, además, otro tipo de variación que consiste en diferencias en el número de copias de determinadas secuencias nucleotídicas que se repiten a lo largo del genoma. Estas secuencias repetitivas del ADN cromosómico han demostrado, en los últimos años, ser marcadores genéticos de gran utilidad (Mascini y col., 2005; Orrú y col., 2006).

La generalización de la utilización de las secuencias repetitivas como marcadores genéticos se debe precisamente a que se amplifican por PCR y a la facilidad de identificar alelos. Cada uno de los alelos de un individuo difiere en el número de unidades repetitivas que contiene en un *locus* determinado. Debido a las elevadas tasas de mutación que presentan las secuencias repetitivas y al gran número de alelos presentes en el genoma, estas regiones constituyen interesantes marcadores para la identificación de especies (Haberfeld y col., 1991).

Las secuencias repetitivas del ADN nuclear se clasifican atendiendo a su tamaño en satélites, minisatélites y microsatélites. Los microsatélites son los más empleados en la actualidad debido a su pequeño tamaño, ya que se amplifican fácilmente mediante PCR. Además, las zonas que flanquean muchos de los microsatélites estudiados son muy conservadas entre especies pertenecientes a la misma familia e incluso al mismo género, permitiendo que los cebadores empleados para amplificar un microsatélite en una especie, se puedan emplear también en otras (Orrú y col., 2006).

En el campo de la identificación de especies animales, el estudio de las secuencias repetitivas del ADN cromosómico se ha dirigido, sobre todo, al análisis de la variabilidad genética existente entre poblaciones de las principales especies animales de abasto como vaca (Edwards y col., 2000; Maudet y col., 2002; Verkaar y col., 2002), oveja (Arranz y col., 2001; Cockett y col., 2001; Álvarez y col., 2004), cabra (Luikart y col., 1999; Fan y col., 2008) y cerdo (Sancristobal y col., 2006; Megens y col., 2008). Asimismo, se han publicado diversos estudios filogenéticos en especies de caza mayor como cérvidos (Tokarskaya y col., 2000; Poetsch y col., 2001; Li y col., 2002; Royo y col., 2007), bóvidos salvajes (Petit y col., 1997; Pérez y col., 2002) y el jabalí (Rejduch y col., 2004; Rodríguez y col., 2008). Aunque el empleo de esta técnica directamente para la identificación de especies en los alimentos ha sido menor (Janssen y col., 1998; Buntjer y col., 1999; Mascini y col., 2005; Orrú y col., 2006; Sharma y col., 2006), es útil para la detección de polimorfismos y relaciones filogenéticas entre individuos, poblaciones o especies animales.

II.3.2.7. PCR en tiempo real

Actualmente, las técnicas de PCR que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances en las técnicas de PCR se basan en la utilización de compuestos fluorescentes y presentan numerosas ventajas en el análisis rutinario de los alimentos. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte, el equipo proporciona, en tiempo real (según transcurre la reacción de PCR), un resultado no cualitativo, sino numérico, que permite la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Brodmann y Moor, 2003; López-Calleja y col., 2007).

En los últimos años, se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real, que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y específicos. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan "agentes intercaladores fluorescentes" de la doble cadena de ADN como el bromuro de etidio y el SYBR[®] Green). Su principal inconveniente deriva de la posibilidad de producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. Este inconveniente se evita con los sistemas específicos, en los que se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (TaqMan[®], FRET, *molecular beacons* y *scorpions*), que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana. Dentro de los sistemas específicos, las sondas de hibridación tipo TaqMan[®] son las más generalizadas (López-Andreo y col., 2005; Rensen y col., 2006; Laube y col., 2007; López-Calleja y col., 2007; Jonker y col., 2008).

Las aplicaciones de la técnica de PCR en tiempo real son múltiples, aunque el análisis cuantitativo de las secuencias de ácidos nucleicos se ha empleado principalmente en investigación biológica. Las aplicaciones en la industria alimentaria se circunscriben a tres sectores: 1) detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG), 2) detección y enumeración de microorganismos y 3) autenticación de alimentos y piensos.

La técnica de PCR en tiempo real ha permitido detectar y cuantificar diferentes especies animales en productos cárnicos (Walker y col., 2003, 2004; Dooley y col., 2004; Hird y col., 2005; López-Andreo y col., 2005, 2006; Schöenbrucher y col., 2007; Tanabe y col., 2007; Eugster y col., 2008; Jonker y col., 2008), lácteos (López-Calleja y col., 2007; Zhang y col., 2007) y de la pesca (Rehbein y Horstkotte, 2003; Sotelo y col., 2003; López y Pardo, 2005; Rasmussen y col., 2008). No obstante, la aplicación de esta técnica para la detección cuantitativa de especies de caza mayor ha sido, hasta el momento, muy escasa (Fajardo y col., 2008).

Asimismo, esta metodología también se ha aplicado para detectar y cuantificar ADN bovino en harinas y piensos destinados a la alimentación animal (Lahiff y col., 2002; Mendoza-Romero y col., 2004; Chiappini y col., 2005; Krcmar y Rencova, 2005; Rensen y col., 2005, 2006; Frezza y col., 2008).

Brodmann y Moor (2003) utilizaron una técnica de PCR en tiempo real para la detección y semicuantificación de ADN de vaca en piensos. Para ello, diseñaron cebadores y sondas TaqMan® en el gen de la hormona de crecimiento (GH) bovino. El límite de detección conseguido fue del 1%.

Sawyer y col. (2003) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real basándose en la región control del ADN bovino para cuantificar ADN de vaca en productos cárnicos. El límite de detección alcanzado fue del 2%.

Dooley y col. (2004) cuantificaron ADN de vaca, cerdo, oveja, pollo y pavo en productos cárnicos crudos y tratados térmicamente, empleando dos sondas TaqMan® diseñadas en el gen citocromo b. El límite de detección alcanzado fue del 0,5%.

Mendoza-Romero y col. (2004) utilizaron una técnica de PCR en tiempo real basada en secuencias repetitivas del genoma bovino para la detección de ADN de vaca en piensos.

Chisholm y col. (2005) detectaron y cuantificaron ADN de caballo y burro en distintos productos comerciales mediante una técnica de PCR en tiempo real que utilizaba sondas TaqMan® MGB. Los cebadores y sondas empleados, diseñados en el gen mitocondrial citocromo b, detectaban niveles de hasta 1 pg de ADN de burro y 25 pg de ADN de caballo.

Rensen y col., (2005) emplearon una técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de vaca en piensos utilizando sondas de tipo FRET diseñadas en el gen mitocondrial citocromo b. El límite de detección alcanzado fue del 0,001%.

Rodríguez y col. (2005) utilizaron una técnica de PCR en tiempo real y una sonda TaqMan® para cuantificar ADN de cerdo en productos cárnicos.

López-Andreo y col. (2005) consiguieron cuantificar ADN de vaca, cerdo, oveja, pollo, pavo y avestruz en distintos productos comerciales mediante el empleo de sondas TaqMan® MGB diseñadas en el gen nuclear 18S ARNr y en el gen citocromo b. El límite de detección alcanzado fue del 1% en cerdo, pollo, pavo y avestruz, y del 5% en vaca y oveja. Este mismo grupo investigador empleó una técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de vaca, cerdo, caballo y canguro empleando cebadores especie-específicos diseñados en el gen mitocondrial citocromo b y la molécula SYBR® Green (López-Andreo y col., 2006).

Rensen y col. (2006) diseñaron cebadores y sondas específicas tipo FRET para la detección y cuantificación de ADN de rumiantes (vaca, oveja y cabra) en piensos mediante una

técnica de PCR en tiempo real basándose en el gen mitocondrial citocromo b. El límite de detección alcanzado fue del 0,05% en vaca y del 0,1% en oveja.

Frezza y col. (2008) diseñaron cebadores específicos para detectar y cuantificar ADN de vaca, oveja, cerdo y pollo en piensos animales gracias al empleo del intercalador fluorescente SYBR® Green en un ensayo de PCR en tiempo real. El límite de detección de la técnica fue de 0,01, 0,05 y 0,5 ng de ADN para vaca, oveja y pollo, respectivamente.

Jonker y col. (2008) utilizaron una técnica de PCR en tiempo real basada en el empleo de sondas TaqMan® para la detección y cuantificación de ADN de vaca, oveja, cerdo, caballo, pollo y pavo en productos cárnicos procesados. El límite de detección alcanzado fue del 0,01%.

CAPÍTULO III
RESULTS AND DISCUSSION
(Published articles)



III.1. AUTHENTICATION OF GAME MEATS BY GENETIC TECHNIQUES

III.1.1. PCR-RFLP TECHNIQUES

- PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2006, 54, 1140-1150.
- Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Journal of AOAC International** 2007, 90, 179-186.
- Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes. **Meat Science** 2008, 78, 314-322.
- Application of PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the species identification of game and domestic meats. **Journal of the Science Food and Agriculture** (manuscript in press).

PCR-RFLP Authentication of Meats from Red Deer
(*Cervus elaphus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer
(*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*),
and Goat (*Capra hircus*)

VIOLETA FAJARDO, ISABEL GONZÁLEZ,* INÉS LÓPEZ-CALLEJA, IRENE MARTÍN,
PABLO E. HERNÁNDEZ, TERESA GARCÍA, AND ROSARIO MARTÍN

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

PCR-RFLP analysis has been applied to the identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). PCR amplification was carried out using a set of primers flanking a conserved region of ~712 base pairs from the mitochondrial 12S rRNA gene. Restriction site analysis based on sequence data from this DNA fragment permitted the selection of *Mse*I, *Mbo*II, *Bst*II, and *Apo*I endonucleases for species identification. The restriction profiles obtained when amplicons were digested with the chosen enzymes allowed the unequivocal identification of all domestic and game meat species analyzed in the present work.

KEYWORDS: Game meat; species identification; 12S rRNA gene; PCR-RFLP

INTRODUCTION

The consumption of game meat is growing in many parts of the world because of its extraordinary health and sensory characteristics: it is low in fat and cholesterol, the animals have not been treated with hormones or steroids, and the meat has a fine texture and delicate flavor when prepared properly (1, 2).

Consumers increasingly demand higher protection from falsely labeled food for a variety of economic, religious, and health reasons. However, falsification of game meat products is becoming very common due to the tremendous profit that results from selling less costly meat as meat from higher priced species in great demand. Thus, the prevention of such fraudulent practices, nowadays, constitutes an important part of food regulatory control and quality assurance systems. In this context, development of reliable and simple tools for the authentication of meat from game species is necessary for wildlife law enforcement and to assess their proper use in processed game products (3, 4).

Conventional methodology used for the determination of the species origin in meat products has been predominantly based on the immunochemical and electrophoretic analysis of proteins (5, 6). Alternatively, DNA analysis constitutes an attractive strategy for meat species identification. In comparison with proteins, DNA is stable against technological treatments and independent of the considered tissue. For these reasons, nucleic acid based techniques are now the preferred approaches for species identification in food products (7–9).

In recent years, an extensive number of works have been developed that use Polymerase Chain Reaction (PCR) coupled with techniques such as nucleotide-sequencing, single-strand conformation polymorphism (SSCP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), or restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of domestic meat species such as cattle, sheep, goat, pig, turkey, or chicken (10–14). However, fewer studies have been published so far reporting the application of DNA-based techniques for game meat authentication (1, 2, 4, 15, 16).

Meat from venison is becoming increasingly popular in European markets. The three main species consumed in Europe are the red deer (*Cervus elaphus*), the fallow deer (*Dama dama*), and the roe deer (*Capreolus capreolus*). These animals are reported to produce a leaner, more flavorful, and also more expensive meat than their domestic counterparts. In the present work we describe a method for the specific identification of game meats from red deer, fallow deer, and roe deer based on PCR-RFLP analysis of a conserved fragment from the mitochondrial 12S rRNA gene. The assay is also intended to enable the differentiation between these cervid meats and those from cattle, sheep, and goat domestic species.

MATERIALS AND METHODS

Sample Selection and DNA Extraction. Authentic muscle samples of red deer, fallow deer, and roe deer were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas),

* Corresponding author (telephone 34-913943751; fax 34-913943743; e-mail gonzalzi@vet.ucm.es).

Meat Authentication

and Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo). Cattle, sheep, and goat meat samples were obtained from local abattoirs (Madrid, Spain). All specimens were morphologically identified before the samples were obtained.

Several processed game meat products were also obtained from different retail markets. These included dried salt-cured and heat-treated meat samples from red deer and roe deer species.

Genomic DNA was extracted from meat using a Wizard DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI). The extraction was performed as follows: 0.2 g of meat was homogenized with 860 μ L of extraction buffer (10 mM Tris, pH 8.0; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS), 100 μ L of 5 M guanidine-hydrochloride, and 40 μ L of 20 mg/mL proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). The samples were incubated overnight at 55 °C with shaking at 60 rpm (C24KC, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ). After incubation, they were left to cool at room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to the lysate before centrifugation at 13000 rpm for 10 min. The aqueous phase (500 μ L) was carefully transferred to a fresh tube to purify the DNA using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega) with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. Finally, the DNA was eluted in 50–100 μ L of sterile deionized water, and its concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm.

PCR Amplification of a Conserved 12S rRNA Gene Fragment from Red Deer, Fallow Deer, Roe Deer, Cattle, Sheep, and Goat Meats. The set of primers used for amplification consisted of 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides:

12S-FW: 5'-GGTAAATCTCGTGCCAGCCA-3'

12S-REV: 5'-TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGAC-3'

They were designed for the amplification of a conserved fragment of the 12S rRNA gene, based on sequences available in the Genbank/EMBL database for various mammal species. This set of primers was expected to produce amplicons of the same length (~712 bp) in the six meat species analyzed in this work.

PCR amplification reactions were performed in a total volume of 50 μ L. Each reaction mixture contained 100–200 ng of template DNA, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 μ M of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 2 units of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, and 0.001% BSA.

PCR amplification was carried out in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, U.K.). Thirty-five cycles of amplification with the following step cycle profile were programmed: strand denaturation at 93 °C for 30 s, primer annealing at 65 °C for 30 s, and primer extension at 72 °C for 45 s. An initial denaturation at 93 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 5 min improved the product yield. PCR products (10 μ L) were mixed with 2 μ L of gel loading solution (Sigma) and loaded in a 1.5% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1 μ g/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 110 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Sequencing of the PCR Products. PCR products (90 μ L) amplified with 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides from red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, and goat were loaded in a 2% LM2 (Hispanlab) agarose gel containing 1 μ g/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer and electrophoresed at 90 V for 70 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light using a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). A Geldoc 1000 System-PC (Bio-Rad) was used for that purpose. Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). DNA

sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) using 12S-FW and 12S-REV primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer).

Restriction Site Mapping and Enzymatic Digestion of the Amplified DNA Fragments. Alignment and restriction site mapping of 12S rRNA gene sequences obtained from red deer (AJ 885204, AJ 885205, AJ 885206), fallow deer (AJ 885203), roe deer (AJ 885202, AJ 972679, AJ 972680, AJ 972681, AJ 972682, AJ 972683), cattle (AJ 885201), sheep (AJ 885200), and goat (AJ 885199) were performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. From the detailed comparison of the sequence maps, *MseI*, *MboII*, *BstI*, and *ApoI* endonucleases (New England BioLabs, Beverly, MA) were selected for meat species identification.

Digestions were performed in a total volume of 20 L containing 100–200 ng of amplified DNA, 5–10 units of enzyme, and 10 L of 10 \times digestion buffer recommended by the manufacturer and were incubated at the appropriate temperature of each endonuclease during 16 h. The resulting fragments were separated by electrophoresis in a 3.5% MS8 (Hispanlab) agarose gel at 70 V for 90 min. The sizes of the resulting DNA fragments were estimated by comparison with a commercial standard (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

RESULTS AND DISCUSSION

The food analyst is confronted with providing proof of fraudulent substitution of more expensive meats with cheaper ones (8). To detect such frauds, analysis of RFLP of PCR products has gained acceptance among meat species identification methods (3, 4, 12). The present study aimed to develop a PCR-RFLP technique for the specific identification of meats from the cervid species red deer (*C. elaphus*), fallow deer (*D. dama*), and roe deer (*C. capreolus*), targeting sequences of the 12S rRNA gene. The technique was also applied to the differentiation of these game meats from those of bovine, caprine, and ovine species.

PCR has the potential sensitivity and specificity required to achieve detection of a target sequence from template DNA (8, 17). The mitochondrial 12S rRNA gene has been selected in this study as template for DNA amplification because it has an acceptable length and an adequate grade of mutation and there are numerous sequences available in the databases (10, 18, 19). The mitochondrial primers 12S-FW and 12S-REV used in the PCR technique developed in this work successfully amplified a conserved 712 bp region from the 12S rRNA gene of all red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, and goat individuals analyzed (results not shown).

Following amplification, the use of PCR-RFLP analysis to identify the origin of an unknown sample may be possible thanks to the use of the appropriate restriction endonucleases (13, 20). However, previous sequence data from authentic specimens are needed to provide species-specific reference restriction patterns. For that purpose, 12S PCR products from at least 11 individuals of each selected meat species were purified from the gel and sequenced. Restriction map analysis of the 12S rRNA gene sequences obtained from red deer (AJ 885204, AJ 885205, AJ 885206), fallow deer (AJ 885203), roe deer (AJ 885202, AJ 972679, AJ 972680, AJ 972681, AJ 972682, AJ 972683), cattle (AJ 885201), sheep (AJ 885200), and goat (AJ 885199) allowed the selection of *MseI* endonuclease, as well as a combination of *MboII*, *BstI*, and *ApoI* enzymes, as potential tools for the suitable identification of meats from the six analyzed species (Figure 1). As shown in the figure, the presence of a few nucleotide polymorphisms within some individuals of red deer and roe deer generated more than one 12S rRNA gene sequence type for these two species. The cleavage patterns predicted from sequence map analysis are indicated in Table 1.

		1	128-FW→		MseI	MseI		70
<i>C. elaphus</i> 1	(AJ 885204)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCATACGGC	GTAAGTGTG
<i>C. elaphus</i> 2	(AJ 885205)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCATACGGC	GTAAGTGTG
<i>C. elaphus</i> 3	(AJ 885206)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCATACGGC	GTAAGTGTG
<i>D. dama</i>	(AJ 885203)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGCCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	AGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 1	(AJ 885202)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 2	(AJ 972679)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 3	(AJ 972680)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 4	(AJ 972681)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 5	(AJ 972682)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. capreol</i> 6	(AJ 972683)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGTTAAATA	GGCACACGGC	GTAAGCGGTG
<i>C. hircus</i>	(AJ 885199)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGCTAAACA	GGAATACGGC	GTAAGCGGTG
<i>B. taurus</i>	(AJ 885201)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTAAACC	CAAGCTAAACA	GGAGTACGGC	GTAAGCGGTG
<i>O. aries</i>	(AJ 885200)	GGTAAATCTC	GTGCCAGCCA	CGCGGGTCAT	ACGATTGAACC	CAAGCTAAACA	GGAGTACGGC	GTAAGCGGTG

		71	MseI	MseI	ApoI	MseI	MseI	140
C. elaphus1	(AJ 885204)	TTAAAGCACT	ATACTAAATA	AAGTTAAATT	GCAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTGTA	ACAAAAATAT
C. elaphus2	(AJ 885205)	TTAAAGCACT	ATACTAAATA	AAGTTAAATT	GCAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTGTA	ACAAAAATAT
C. elaphus3	(AJ 885206)	TTAAAGCACT	ATACTAAATA	AAGTTAAATT	GCAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTGTA	ACAAAAATAT
D. dama	(AJ 885203)	TTAAAGCACT	GTACTAAATA	AAGTTAAATT	GCAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTGCA	ACAAAAATAA
C. capreol1	(AJ 885202)	TTAAAGCATT	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. capreol2	(AJ 972679)	TTAAAGCATT	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. capreol3	(AJ 972680)	TTAAAGCATT	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. capreol4	(AJ 972681)	TTAAAGCATC	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. capreol5	(AJ 972682)	TTAAAGCATC	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. capreol6	(AJ 972683)	TTAAAGCATC	CTATAAAATA	AGGTTCAATC	CTAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ATGAAATATG
C. hircus	(AJ 885199)	TTAAAGCACT	ACATCAAATA	GAGTTAAATT	GTAATTAAAC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ACAAAAATAG
B. taurus	(AJ 885201)	TTAAAGCACC	ATACCAAATA	GGGTTAAATT	CTAACTAAGC	TGTA AAAAAGC	CATGATTAATA	ATAAAAATAA
O. aries	(AJ 885200)	TTAAAGCATC	ATACTAAATA	AAGTTAAATT	GCAATTAAAGC	TGTA AAAAAGC	CATAATTACA	ACAAAAATAT

		141	NseI		BsiI	210		
<i>C. elaphus</i> 1	(AJ 885204)	ATAACGAAAG	TAACTTTACA	ACCGCTGAAA	CACGATAGCT	AGGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. elaphus</i> 2	(AJ 885205)	ATAACGAAAG	TAACTTTACA	ACCGCTGAAA	CACGATAGCT	AGGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. elaphus</i> 3	(AJ 885206)	ATAACGAAAG	TAACTTTACA	ACCGCTGAAA	CACGATAGCT	AGGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>D. dama</i>	(AJ 885203)	ACAACGAAAG	TAACTTTATA	CGCGCTGAAA	CACGATAGCT	AGGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 1	(AJ 885202)	ATAACGAAAG	TAACTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 2	(AJ 972679)	ATAACGAAAG	TAACTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 3	(AJ 972680)	ATAACGAAAG	TAACTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 4	(AJ 972681)	ATAACGAAAG	TAACTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 5	(AJ 972682)	ATAACGAAAG	TAGCTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. capreol</i> 6	(AJ 972683)	ATAACGAAAG	TAACTTTAAA	ATAGCTGAAA	CACGATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>C. hircus</i>	(AJ 885199)	ATGACGAAAG	TAAACCTACT	GCAGCTGATA	CACTATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>B. taurus</i>	(AJ 885201)	ATGACGAAAG	TGACCCCTACA	ATAGCCGAGC	CACATATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT
<i>O. aries</i>	(AJ 885200)	ATGACGAAAG	TAAACCTACA	ATAGCTGATA	CACATATAGCT	AAGACCCAAA	CTGGGATTAG	ATACCCCCT

		211	MseI	MseI		MseI 280		
<i>C. elaphus</i> 1	(AJ 885204)	ATGCCTAGCC	TTAA ACACAA	ATAGTTATGC	AAACAAAAC	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. elaphus</i> 2	(AJ 885205)	ATGCCTAGCC	TAA ACACAA	ATAGTTATGC	AAACAAAAC	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. elaphus</i> 3	(AJ 885206)	ATGCCTAGCC	TTAA ACACAA	ATAGTTATGC	AAACAAAAC	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>D. dama</i>	(AJ 885203)	ATGCCTAGCC	CTAAACACAA	ATAGTTTGGT	AAACAAAAC	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 1	(AJ 885202)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	GTAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 2	(AJ 972679)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	ATAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 3	(AJ 972680)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	GTAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 4	(AJ 972681)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	GTAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 5	(AJ 972682)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	GTAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. capreol</i> 6	(AJ 972683)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	GTAAT TTA TA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAATAGC TTA
<i>C. hircus</i>	(AJ 885199)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	ATAATTACAG	AAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CAACAGCCCG
<i>B. taurus</i>	(AJ 885201)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	ATAATTACAT	AAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACTAG	CACAGC TTA
<i>O. aries</i>	(AJ 885200)	ATGCTTAGCC	CTAAACACAA	ATAATTATAA	TAAACAAAAT	ATTGCGCAGA	GTACTACCGG	CACAGCCCG

		281		BslI		350		
C. elaphus1 (AJ 885204)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. elaphus2 (AJ 885205)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. elaphus3 (AJ 885206)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
D. dama (AJ 885203)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol1 (AJ 885202)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol2 (AJ 972679)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol3 (AJ 972680)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol4 (AJ 972681)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol5 (AJ 972682)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. capreol6 (AJ 972683)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
C. hircus (AJ 885199)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
B. taurus (AJ 885201)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT
O. aries (AJ 885200)		AAACTCAAAG	GACTTGGCGG	TGCTTTTATAC	CCTTCTAGAG	GAGCCTGTTC	TATAATCGAT	AAACCCCGAT

		351			MboII		BsII	420
<i>C. elaphus1</i>	(AJ 885204)	AAACCTCACC	ATTCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCG	AA	CGCTAAAAA A-GGTACAAA
<i>C. elaphus2</i>	(AJ 885205)	AAACCTCACC	ATTCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCG	AA	CGCTAAAAA A-GGTACAAA
<i>C. elaphus3</i>	(AJ 885206)	AAACCTCACC	ATTCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCG	AA	CGCTAAAAA A-GGTACAAA
<i>D. dama</i>	(AJ 885203)	AAACCTCACC	ATTCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ACCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGTACAAA
<i>C. capreol1</i>	(AJ 885202)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. capreol2</i>	(AJ 972679)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. capreol3</i>	(AJ 972680)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. capreol4</i>	(AJ 972681)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. capreol5</i>	(AJ 972682)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. capreol6</i>	(AJ 972683)	AGACCTCACC	ACCCCTTGCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>C. hircus</i>	(AJ 885199)	AAACCTCACC	AATCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAACAAA
<i>B. taurus</i>	(AJ 885201)	AAACCTCACC	AATCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA A-GGAATAAA
<i>O. aries</i>	(AJ 885200)	AAACCTCACC	AATCTTGTCT	AATACAGTCT	ATATACCGCC	ATCTTCAGCA	AA	CGCTAAAAA AAGGACAAAA

		421				BslI	MboII	490
<i>C. elaphus1</i> (AJ 885204)		AGTAAGCACA ATCATAATAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAAACGGAAA	GAAATGGGCT
<i>C. elaphus2</i> (AJ 885205)		AGTAAGCACA ATCATAATAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAAACGGAAA	GAAATGGGCT
<i>C. elaphus3</i> (AJ 885206)		AGTAAGCACA ATCATAATAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAAACGGAAA	GAAATGGGCT
<i>D. dama</i> (AJ 885203)		AGTAAGCACA ATCATAATAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAAATGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo11</i> (AJ 885202)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo12</i> (AJ 972679)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo13</i> (AJ 972680)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo14</i> (AJ 972681)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo15</i> (AJ 972682)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. capreo16</i> (AJ 972683)		AGTAAGCACA ACCATCATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAGGTGGGAA	GAAATGGGCT
<i>C. hircus</i> (AJ 885199)		AGTAAGCTCA ATCACAACAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAATGGGAA	GAAATGGGCT
<i>B. taurus</i> (AJ 885201)		AGTAAGCGTA ATTATGATAC ATAAAAACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GAAATGGGAA	GAAATGGGCT
<i>O. aries</i> (AJ 885200)		AGTAAGCTCA ATAATAACAC ATAAAGACGT TAGGTCAAGG				TGTAACCTAT	GGAGTGGGAA	GAAATGGGCT
		491		MseI	ApoI	MseI		560
<i>C. elaphus1</i> (AJ 885204)		ACATTTTCTA ATCTAAGAAA ATCCAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. elaphus2</i> (AJ 885205)		ACATTTTCTA ATCTAAGAAA ATCCAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. elaphus3</i> (AJ 885206)		ACATTTTCTA ATCTAAGAAA ATCCAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>D. dama</i> (AJ 885203)		ACATTTTCTA ATCTAAGAAA ATCTAATACG AAAGTTATTA				TGAAACTAGT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo11</i> (AJ 885202)		ACATTTTCTA ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo12</i> (AJ 972679)		ACATTTTCTA ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo13</i> (AJ 972680)		ACATTTTCTA ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo14</i> (AJ 972681)		ACATTTTCTG ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo15</i> (AJ 972682)		ACATTTTCTG ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. capreo16</i> (AJ 972683)		ACATTTTCTG ATTTAAGAAA ACTTAAACACG AAAGTTATTA				TGAAATTAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>C. hircus</i> (AJ 885199)		ACATTTTCTA CCTTAAAGAAA ATTTAA -TACG AAAGCCATTA				TGAAATTAAT	GACCAAGGA	GGATTAGTA
<i>B. taurus</i> (AJ 885201)		ACATTTCTCTA CACCAAGAGA ATCAAGACG AAAGTTATTA				TGAAACCAAT	AACCAAGGA	GGATTAGCA
<i>O. aries</i> (AJ 885200)		ACATTTTCTA CCCAAGAGAAA TTCTAA -TACG AAAGCCATTA				TGAAATTAAT	AGCCAAGGA	GGATTAGCA
		561					BslI	630
<i>C. elaphus1</i> (AJ 885204)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAC TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. elaphus2</i> (AJ 885205)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAC TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. elaphus3</i> (AJ 885206)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAC TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>D. dama</i> (AJ 885203)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo11</i> (AJ 885202)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo12</i> (AJ 972679)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo13</i> (AJ 972680)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo14</i> (AJ 972681)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo15</i> (AJ 972682)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. capreo16</i> (AJ 972683)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>C. hircus</i> (AJ 885199)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>B. taurus</i> (AJ 885201)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
<i>O. aries</i> (AJ 885200)		GTAAACTAAG AATAGAGTGC TTAGTTGAAT TAGGCCATGA				AGCAGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCCTC
		631		MseI	ApoI	MseI		700
<i>C. elaphus1</i> (AJ 885204)		AAGTAGGCAC AGTACACTCA AATTTATTG CACGTATTAA				TCATATGAGA	GGAGACAAGT	CGTAACAAGG
<i>C. elaphus2</i> (AJ 885205)		AAGTAGGCAC AGTACACTCA AATTTATTG CACGTATTAA				TCATATGAGA	GGAGACAAGT	CGTAACAAGG
<i>C. elaphus3</i> (AJ 885206)		AAGTAGGCAC AGTACACTCA AATTTATTG CACGTATTAA				TCATATGAGA	GGAGACAAGT	CGTAACAAGG
<i>D. dama</i> (AJ 885203)		AAGTAGGCAC AATACACTGA AATTTATTCA				TACGTATTAA	TCACATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo11</i> (AJ 885202)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo12</i> (AJ 972679)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo13</i> (AJ 972680)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo14</i> (AJ 972681)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo15</i> (AJ 972682)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. capreo16</i> (AJ 972683)		AAATAAGCAA AATACATTGA AATTTATTGA				TACGTATATA	CCATATGAGA	GGAGACAAGT
<i>C. hircus</i> (AJ 885199)		AAGTAATATC AATGCACTCA AGCCTATTAA				CACGCATCAA	CTACATGAGA	GGAGATAAGT
<i>B. taurus</i> (AJ 885201)		AAATAGATTC AGTGCACTCA ACCCTATTGA				AACGCACTAG	CTACATGAGA	GGAGACAAGT
<i>O. aries</i> (AJ 885200)		AAGTAATATC GATATACTTA AACCTATTGA				CATATATCAA	CCACACGAGA	GGAGACAAGT
		701		←12S-REV713				
<i>C. elaphus1</i> (AJ 885204)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. elaphus2</i> (AJ 885205)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. elaphus3</i> (AJ 885206)		TAAGCATACT GGA						
<i>D. dama</i> (AJ 885203)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo11</i> (AJ 885202)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo12</i> (AJ 972679)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo13</i> (AJ 972680)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo14</i> (AJ 972681)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo15</i> (AJ 972682)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. capreo16</i> (AJ 972683)		TAAGCATACT GGA						
<i>C. hircus</i> (AJ 885199)		TAAGCATACT GGA						
<i>B. taurus</i> (AJ 885201)		TAAGCATACT GGA						
<i>O. aries</i> (AJ 885200)		TAAGCATACT GGA						

Figure 1. DNA sequences from part of the 12S rRNA gene of red deer (*C. elaphus*), fallow deer (*D. dama*), roe deer (*C. capreolus*), goat (*C. hircus*), cattle (*B. taurus*), and sheep (*O. aries*). Restriction sites for *MseI* (T/TA), *MboI* (GAAG(A/N)₈), *BslI* (CCNNNNN/NGGG), and *ApoI* (R/AATY) are shaded (N = A, T, C, or G; Y = T or C; R = A or G). Boldfaced nucleotides indicate the position of primers 12S-FW and 12S-REV used for PCR amplification.

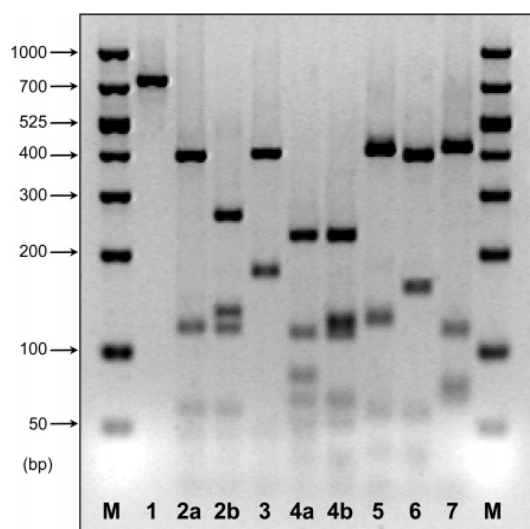
Figure 2 shows the results obtained following restriction analysis of 12S rRNA gene from red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, and goat, after incubation with *MseI* endonuclease. As can be seen, different DNA banding profiles were obtained for each of the six meat species analyzed with this enzyme. However, the few existing 12S rRNA sequence point mutations

within individuals from red deer and roe deer originated two different *MseI* electrophoretic patterns on each of these two species. In this way, *MseI* digestions of red deer samples caused either 9 (line 2a, pattern A) or 10 (line 2b, pattern B) DNA fragments of 388 to 10 bp or 257 to 10 bp, respectively. Similarly, roe deer 12S rRNA gene digestions originated either

Table 1. Lengths of Fragments Generated by Digestion of PCR Products from 12S rRNA Gene with the Indicated Restriction Enzymes^a

<i>n</i> = 25	red deer		fallow deer	roe deer		goat	cattle	sheep
<i>MseI</i>	A (<i>n'</i> = 6)	B (<i>n'</i> = 19)		A (<i>n'</i> = 12)	B (<i>n'</i> = 13)			
	388	257	388	224	224	397	379	407
	116	131	173	112	122	121	152	112
	57	116	46	79	112	57	55	71
	46	57	35	65	65	36	36	65
	35	46	26	51	51	35	35	23 (2)
	26	35	23	43	35	23 (2)	32	7
	23	26	11	35	34	11	23	4
	11	23	10	34	26	9		
	10	11		26	23			
		10		23	10 (2)			
				10 (2)				
<i>MboII</i>		384	489		384	384	384	384
		328	223		223	223	223	223
				105	105	105	105	105
<i>BsiI</i>		223	223		303	240	303	303
		191	191		191	191	191	191
		126	126		126	126	126	126
		92	92		92	92	92	92
		80	80			63		
<i>ApoI</i>		553	553		649	616	616	412
		96	96		63	96	96	204
		63	63					96

^a *n* = number of individuals analyzed from each species; *n'* = number of individuals yielding profile A or B. Boldface type indicates visible DNA fragments in gel images.

**Figure 2.** Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from 12S rRNA gene PCR products digested with *MseI* endonuclease. Samples: (1) undigested PCR product; (2a) red deer RFLP pattern A; (2b) red deer RFLP pattern B; (3) fallow deer; (4a) roe deer RFLP pattern A; (4b) roe deer RFLP pattern B; (5) goat; (6) cattle; (7) sheep. M, molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker Low).

12 (line 4a, pattern A) or 11 (line 4b, pattern B) DNA fragments of 224 to 10 bp. On the other hand, digestions performed with *MseI* endonuclease resulted in eight DNA fragments (388 to 10 bp) in fallow deer and another eight fragments (407 to 4 bp) in sheep. Six restriction sites for this enzyme found in cattle PCR products yielded seven DNA fragments of 379 to 23 bp. Finally, goat samples originated nine fragments of 397 to 9 bp, as expected from the presence of eight recognition sites for *MseI* endonuclease. It should be noted that a number of small DNA fragments resulting from 12S rRNA gene digestions could not be detected after electrophoresis of the samples. However, the

MseI cleavage bands visualized in the gel were enough and suitable for the discrimination of all game and domestic species analyzed.

An advantage of using the endonuclease *MseI* is that only one enzyme allows one-step differentiation of all the species selected in this study. Nevertheless, *MseI* restriction analysis presents two important disadvantages: (i) this enzyme has many recognition sites, thus generating electrophoretic profiles with a high number of DNA fragments that may be difficult to visualize in the gel; (ii) because DNA point mutations may affect *MseI* restriction sites, more than one banding pattern is likely to be generated for a species, as occurs in the present study with red deer and roe deer.

In this work, another approach was used to select a combination of more than one enzyme that could enable PCR-RFLP differentiation of meats from the six game and domestic species, avoiding the limitations of the *MseI* endonuclease. **Figure 3** shows the results obtained following restriction analysis of 12S PCR products from red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, and goat, after incubation with *MboII*, *BsiI*, and *ApoI* endonucleases. As can be deduced from this figure, the combined use of the three mentioned enzymes allowed the specific identification of the six species analyzed in this study: *MboII* endonuclease cleaved the 12S rRNA gene products of both red deer and fallow deer into two DNA fragments of 384/328 and 489/223 bp, respectively, as expected from the presence of a single recognition site in different positions of their sequences. However, two identical *MboII* restriction sites for roe deer, goat, cattle, and sheep PCR products yielded three conserved DNA fragments of 384, 223, and 105 bp (**Figure 3a**). Similarly, the presence of four restriction sites for *BsiI* endonuclease in both red deer and fallow deer 12S rRNA gene sequences caused five DNA fragments of 223, 191, 126, 92, and 80 bp. The three restriction sites for this enzyme found in roe deer, cattle, and sheep PCR products yielded four DNA fragments of 303, 191, 126, and 92 bp, and goat amplicons were cleaved into five DNA fragments of 240, 191, 126, 92, and 63 bp (**Figure 3b**). Finally, digestions performed with *ApoI* endonuclease resulted in three DNA fragments of 553, 96, and 63 bp in red deer and fallow

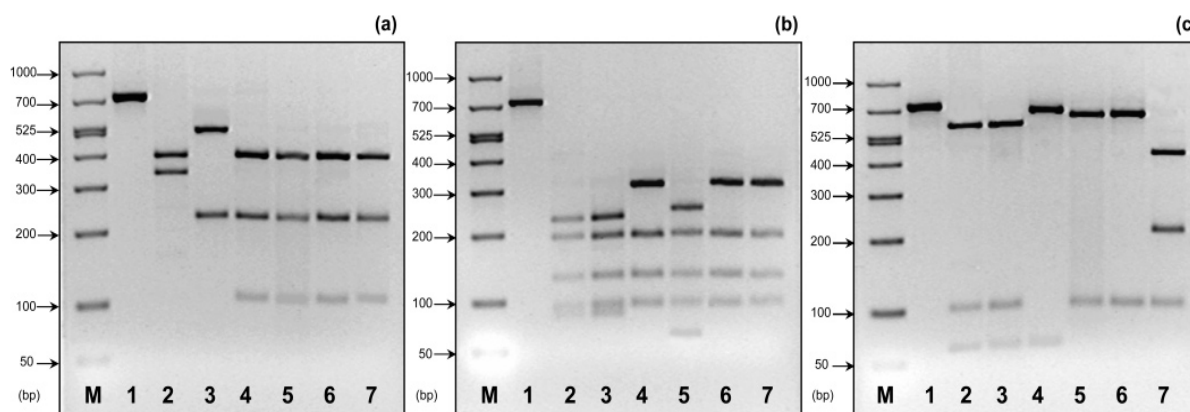


Figure 3. Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from 12S rRNA gene PCR products digested with (a) *MboII*, (b) *BstI*, and (c) *ApoI* endonucleases. Samples: (1) undigested PCR product; (2) red deer; (3) fallow deer; (4) roe deer; (5) goat; (6) cattle; (6) sheep. M, molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker Low).

deer, whereas a single restriction site present in roe deer sequence generated two DNA fragments of 649 and 63 bp. Two restriction sites for this enzyme found in sheep samples yielded three DNA fragments of 412, 204, and 96 bp, and cattle and goat samples, with one *ApoI* restriction site, caused two DNA fragments of 616 and 96 bp (Figure 3c). In this case, it should be also noted that resolution of the agarose gel did not allow visualization of the smallest fragments that resulted from digestions.

The results obtained suggest that, compared with *MseI* endonuclease profiles, the DNA restriction patterns obtained after digestion of the amplicons with *MboII*, *BstI*, and *ApoI* enzymes consisted of a more discrete number of bands, which facilitated the interpretation of the results. Besides, it is worth mentioning that the band sizes obtained by agarose gel electrophoresis after cleavage of PCR products with all selected endonucleases were in agreement with the expected sizes for the restriction fragments inferred from sequence analysis.

Many of the studies published to date about game species identification by the PCR-RFLP technique rely on the use of the cytochrome *b* gene included in the mitochondrial DNA (3, 4, 16). These works have been shown to provide a valuable means for rapidly testing species. However, mutations among individuals make the selection of endonucleases in conserved restriction sites difficult, and several enzymes are often needed to discriminate between phylogenetically related species (4). In the present work, the intraspecific nucleotide substitutions within red deer and roe deer 12S rRNA gene were shown to interfere with some of the recognition sites for *MseI*, giving rise to two different restriction profiles for these species. However, conserved restriction sites found for *MboII*, *BstI*, and *ApoI* endonucleases among all red deer, roe deer, fallow deer, cattle, sheep, and goat 12S rRNA gene sequences facilitated consistent and unequivocal species-specific identification. Twenty-five specimens from each species obtained from different origins were analyzed, suggesting reproducibility of PCR-RFLP patterns with the use of all selected endonucleases.

To check the influence of processing treatments on the suitability of the PCR-RFLP method developed in this work, 12 commercial game products, including 3 dried salt-cured and 3 heat-treated meats from each red deer and roe deer species, were also assayed. The first samples (dried-cured) were correctly analyzed by the PCR-RFLP technique developed, because amplification of the 712 bp DNA fragment was successfully achieved with the conserved primers, and subsequent restriction of the amplicons with the selected endonu-

cleases was, thus, possible. Results obtained after PCR-RFLP analysis indicated that the species origin of the dried salt-cured products was in accordance with their label statements. On the contrary, PCR amplification of the 712 bp fragment could not be accomplished in commercial samples subjected to more destructive processing, such as the case of the thermally treated meat (results not shown). This is ascribed to the fact that thermal treatment strongly accelerates DNA degradation from the samples and, consequently, amplification of particularly large DNA fragments such as the 712 bp one is impeded. Thus, PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA fragment targeted in our study cannot be applied for species identification in thermally treated meats. In the analysis of food matrices in which thermal action or other processing effects may degrade the DNA present in the food tissues, PCR using specific primers targeting short DNA fragments may be used as an alternative technique for species identification (21).

Our results allow us to conclude that PCR-RFLP of the mitochondrial 12S rRNA gene is a suitable alternative that can be applied to the detection of fraudulent or unintentional mislabeling of domestic and game meat species present in commercialized products such as raw and dried salt-cured meats. Compared to alternative methods, such as DNA-sequencing and nucleotide sequence analysis (1, 19), PCR-RFLP combines simplicity, speed, resolving power, and low cost. Consequently, the reported technique can be routinely applied by meat industries as a tool to warrant the quality and authenticity of the products offered for sale (4, 13).

ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha) and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

LITERATURE CITED

- (1) Brodmann, P. D.; Nicholas, G.; Schaltenbrand, P.; Ilg, E. C. Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212, 491–496.

- (2) Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Nakai, H.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shimura, Y. Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Sci.* **1998**, *49*, 379–385.
- (3) Pfeiffer, I.; Burger, J.; Brenig, B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. *Genetics* **2004**, *5*, 30.
- (4) Wolf, C.; Rentsch, J.; Hübner, P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1350–1355.
- (5) Chen, F. C.; Hsieh, Y. H. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 79–85.
- (6) McCormick, R. J.; Collins, D. A.; Field, R. A.; Moore, T. D. Identification of meat from game and domestic species. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 516–517.
- (7) Buntjer, J. B.; Lenstra, J. A. Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *21*, 121–127.
- (8) Herman, B. L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *J. Dairy Res.* **2001**, *68*, 429–436.
- (9) Sáez, R.; Sanz, Y.; Toldrá, F. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 659–665.
- (10) Girish, P. S.; Anjaneyulu, A. S. R.; Viswas, K. N.; Anand, M.; Rajkumar, N.; Shivakumar, B. M.; Bhaskar, S. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 551–556.
- (11) Koh, M. C.; Lim, C. H.; Chua, S. B.; Chew, S. T.; Phang, S. T. W. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Sci.* **1998**, *48*, 275–285.
- (12) Sun, Y. L.; Lin, C. S. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1771–1776.
- (13) Meyer, R.; Höfelein, C.; Lüthy, L.; Candrian, U. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 1542–1551.
- (14) Rea, S.; Chikuni, K.; Avellini, P. Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating european pig and wild boar meat samples. *J. Food Sci.* **1996**, *3*, 211–220.
- (15) Colombo, F.; Cardia, A.; Renon, P.; Cantóni, C. A. Note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 753–755.
- (16) Verkaar, E. L. C.; Nijman, I. J.; Boutaga, K.; Lenstra, J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* **2002**, *60*, 365–369.
- (17) Comincini, S.; Sironi, M.; Bandi, C.; Giunta, C.; Rubini, M.; Fontana, F. RAPD analysis of systematic relationships among the *Cervidae*. *Heredity* **1996**, *76*, 215–221.
- (18) Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A.; Saunders, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1987**, *18*, 489–522.
- (19) Kocher, T. D.; Thomas, W. K.; Meyer, A.; Edwards, S. V.; Pääbo, S.; Villablanca, F. X.; Wilson, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6196–6200.
- (20) Cronin, M. A. Analysis of total mitochondrial DNA (mtDNA) with restriction enzymes to identify mtDNA genotypes among North American cervids: moose, caribou, elk, white-tailed deer and mule deer. *J. Mammal.* **1992**, *73*, 70–82.
- (21) Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Nakai, H.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shimura, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* **1999**, *51*, 143–148.

Received for review July 22, 2005. Revised manuscript received November 16, 2005. Accepted December 1, 2005. This study was supported by Grant AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. V.F. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). I.L.-C. and I.M. are the recipients of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

JF051766R

FOOD COMPOSITION AND ADDITIVES

Analysis of Mitochondrial DNA for Authentication of Meats from Chamois (*Rupicapra rupicapra*), Pyrenean Ibex (*Capra pyrenaica*), and Mouflon (*Ovis ammon*) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

VIOLETA FAJARDO, ISABEL GONZÁLEZ,¹ INÉS LÓPEZ-CALLEJA, IRENE MARTÍN, MARÍA ROJAS, MIGUEL ÁNGEL PAVÓN, PABLO E. HERNÁNDEZ, TERESA GARCÍA, and ROSARIO MARTÍN

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, 28040 Madrid, Spain

The prevention of fraudulent labeling of game meat constitutes an important part of food regulatory control and quality assurance systems. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis based on mitochondrial deoxyribonucleic acid (DNA) was developed for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*). Amplification and restriction site analysis of a DNA fragment about 720 base pairs (bp) from the mitochondrial 12S rRNA gene of all analyzed species permitted the selection of *Mse*I and *Apo*I endonucleases for meat speciation. The 12S rRNA restriction profiles obtained allowed the unequivocal identification of chamois, pyrenean ibex, and mouflon/sheep and their differentiation from meats of domestic species such as cattle, goat, and swine. The highly variable mitochondrial D-loop gene was also targeted to attempt discrimination between mouflon and sheep meats. A D-loop region (700–1000 bp) was amplified and sequenced in all game and domestic species analyzed, and a primer set was designed for the selective amplification of a 370 bp DNA fragment from mouflon and sheep. PCR-RFLP analysis with the selected *Ma*ell enzyme generated a single electrophoretic profile characteristic for sheep, whereas 3 different fragment patterns were obtained for mouflon meats. Consequently, the PCR-RFLP technique developed can be routinely applied in inspection programs in order to verify the correct labeling of game species.

particular type of product in which adulteration may take place is game meat, where the substitution of costly meat with a cheaper one is a common fraud (2). This fact, together with the increasing demand of consumers for information on the source and composition of food, has propelled the development of more accurate and powerful analysis methods focused on the identification of the species origin of meat (3, 4).

Numerous analytical approaches have been developed for the authentication of meat products, including methods based on the detection of deoxyribonucleic acid (DNA; 5) or ribonucleic acid (RNA; 6), immunological (7), electrophoretic (8), and chromatographic techniques (9). DNA-based assays are particularly powerful in the analysis of food ingredients because DNA is less liable to be disrupted than are many proteins, identification is not dependent on the tissue, and sequence data can be analyzed at different levels of specificity, from groups or species to variants or genetically modified individuals (10).

Among genetic approaches applied to meat authentication, polymerase chain reaction (PCR) is currently considered the method of choice for identifying species (11, 12). PCR-mediated techniques include the use of conserved mitochondrial or nuclear DNA primers for PCR amplification, followed by sequencing (13), restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP; 14, 15), multiplex PCR (16), randomly amplified polymorphic DNA (17), or single-stranded conformational polymorphism (18). In particular, PCR-RFLP analysis of selected DNA markers offers a number of advantages over other genetic techniques: (1) one universal PCR-primer system in combination with a few restriction enzymes (RE) can be sufficient for species identification; (2) no references are necessary once the restriction patterns of the species of interest have been determined; (3) a careful selection of RE prevents ambiguous results caused by intraspecies polymorphism; and (4) PCR-RFLP constitutes a simpler alternative to sequencing

Food labeling regulations require that the species of meat in meat products are accurately declared. However, fraudulent or unintentional mislabeling still exists and may not be detected, resulting in poor food quality (1). A

Received May 30, 2006. Accepted by SG July 27, 2006.

¹ Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: gonzalez@vet.ucm.es

Table 1. DNA sequences of the oligonucleotide primers used in this study

Primers	Length, bp	Sequence (5' to 3')	Description
12S-FW	20	GGTAAATCTCGTGCCAGCCA	Conserved 12S rRNA forward primer
12S-REV	25	TCCAGTATGCTTACCTTGTACGAC	Conserved 12S rRNA reverse primer
DLOOP-FW	23	GGTCTTGTAACCCAGANAAGGAG	Conserved D-loop forward primer
DLOOP-REV	19	TGACGGCCATNGCTGAGTC	Conserved D-loop reverse primer
MSDLOOP-FW	27	GTTTCATCAACCCACATAGCTTATGTC	Mouflon/sheep D-loop forward primer
MSDLOOP-REV	22	CATGCTTCAGTGAAACGAATGT	Mouflon/sheep D-loop reverse primer

for the identification of genetic variation between and within species (3, 19).

Both nuclear and mitochondrial (mt) genes have been targeted for species detection in meat by PCR-RFLP. The advantage of mitochondrial-based DNA analysis derives from the fact that there are many mitochondria per cell and many DNA molecules within each mitochondrion, making mt DNA a naturally amplified source of genetic variation (12). Among mitochondrial genes, the cytochrome b (2, 4, 14, 19–21), the 12S and 16S ribosomal RNA subunits (15, 22–24), and the displacement loop (D-loop) region (11, 25–29) are the most widely used markers in the development of DNA methods for species identification and population studies.

The present work reports a PCR-RFLP technique targeting sequences from the mitochondrial 12S rRNA and D-loop regions for the identification of meats from wild game species, such as chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*). The assay is also intended to enable the differentiation between these game meats and those from cattle, sheep, goat, and swine domestic species.

Experimental

Selection of Meat Samples and DNA Extraction

Authentic muscle samples of chamois (*R. rupicapra*), mouflon (*O. ammon*), and pyrenean ibex (*C. pyrenaica*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz). Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species was morphologically identified before the samples were obtained.

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described in a previous work (24).

PCR-RFLP Analysis of Chamois, Pyrenean Ibex, Mouflon, Sheep, Cattle, Goat, and Swine Meats on the Mitochondrial 12S rRNA Region

PCR and sequencing.—A set of primers (12S-FW/12S-REV) was designed for the amplification of a conserved fragment of the 12S rRNA gene, based on sequences available in the Genbank/European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database for various mammal species (Table 1). This set of primers was expected to produce amplicons of the same length [ca 712 base (bp)] in the 6 meat species analyzed. EMBOSS software package Version 2.2.0. and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for primer design.

PCR amplification reactions were performed in a total volume of 50 μ L. Each reaction mixture contained 100–200 ng template DNA, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M each dNTP, 5 pmol each primer, and 2 units *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, and 0.001% bovine serum albumin (BSA).

PCR amplification was performed in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK). Thirty-five cycles of amplification with the following step cycle profile were programmed: strand denaturation at 93°C for 30 s, primer annealing at 65°C for 30 s, and primer extension at 72°C for 45 s. An initial denaturation at 93°C for 2 min and a final extension at 72°C for 5 min improved the product yield. PCR products (10 μ L) were mixed with 2 μ L gel loading solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and loaded in a 1.5% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1 μ g/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer [0.04 M Tris-acetate and 0.001 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0]. Electrophoretic separation was performed at 110 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by ultraviolet (UV) transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

For sequencing, PCR products (90 μ L) amplified with 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides from chamois, pyrenean ibex, mouflon, cattle, sheep, goat, and swine were loaded in a 2% LM2 (Hispanlab) agarose gel containing

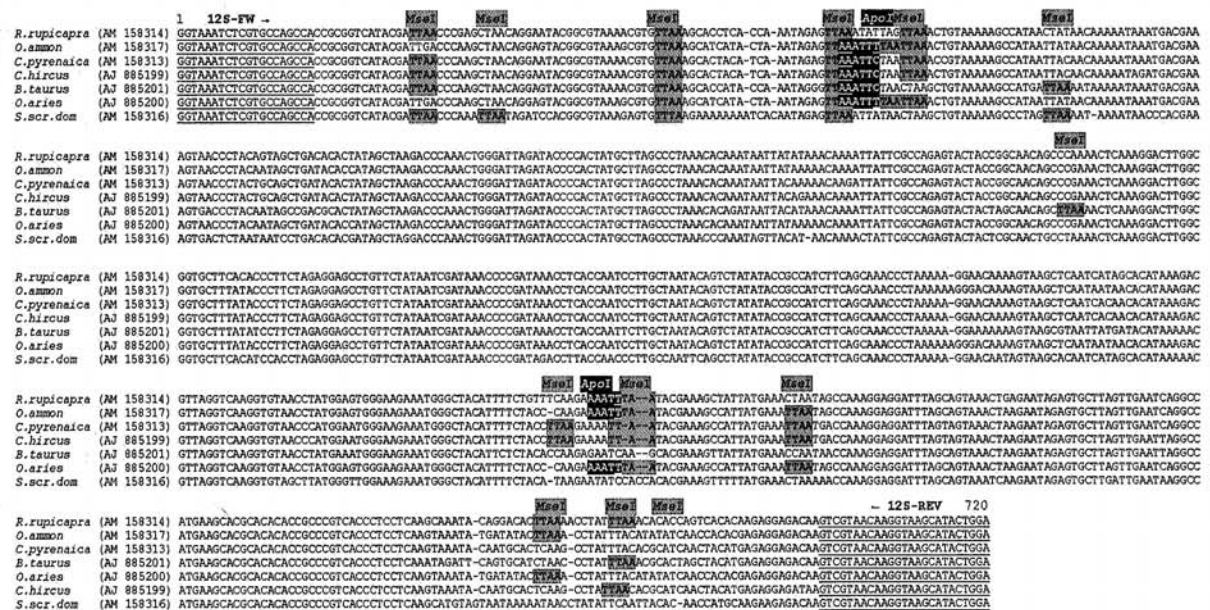


Figure 1. DNA sequence alignment of part of the 12S rRNA gene from chamois (*R. rupicapra*), pyrenean ibex (*C. pyrenaica*), mouflon (*O. ammon*), sheep (*O. aries*), cattle (*B. taurus*), goat (*C. hircus*), and swine (*S. scrofa domestica*). Restriction sites for *MseI* (T/TAA) and *ApoI* (R/AATY) are shown with shadow (R = A or G; Y = T or C). Underlined nucleotides indicate the position of primers 12S-FW and 12S-REV used for PCR amplification.

1 µg/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer, and electrophoresed at 90 V for 70 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light with a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit™ (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis using a standard as reference marker (REAL™, Durviz S.L., Valencia, Spain). A Geldoc 1000 System-PC (Bio-Rad) was used for that purpose. Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). DNA sequencing was accomplished in an ABI Prism Model 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems) using 12S-FW and 12S-REV primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer).

PCR-RFLP analysis.—Restriction site mapping of 12S rRNA gene sequences obtained from chamois (AM 158314), pyrenean ibex (AM 158313), mouflon (AM 158317), sheep (AJ 885200), cattle (AJ 885201), goat (AJ 885199), and swine (AM 158316) was performed using the EMBOSS software package, Version 2.2.0. From the detailed comparison of the sequence maps, *MseI* and *ApoI* endonucleases (New England BioLabs, Beverly, MA) were selected for meat species identification.

Digestions were performed in a total volume of 20 µL containing 100–200 ng amplified DNA, 5–10 units enzyme, and 2 µL 10X digestion buffer recommended by the manufacturer. Reactions were incubated at the appropriate

temperature of each endonuclease for 16 h, and the resulting fragments were separated by electrophoresis in a 3.5% MS8 (Hispanlab) agarose gel at 70 V for 90 min. The sizes of the resulting DNA fragments were estimated by comparison with a commercial standard (Biomarker™ Low, Bio Ventures Inc., Murfreesboro, TN).

PCR-RFLP Analysis of Mouflon and Sheep Meats on the Mitochondrial D-loop Region

PCR and sequencing.—DLOOP-FW and DLOOP-REV conserved oligonucleotides (Table 1) were designed for the amplification of a DNA region 700–1000 bp on the mt D-loop region of chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep, cattle, goat, and swine meats, based on sequences available in the Genbank/EMBL database for various mammal species.

Double-stranded amplifications were carried out in a total volume of 25 µL. Each reaction mixture contained 100–200 ng template DNA, 2 mM MgCl₂, 200 µM each dNTP, 5 pmol each primer, and 1 unit *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, and 0.001% BSA.

PCR was programmed to perform a denaturation step of 94°C for 3 min, followed by 40 cycles consisting of 20 s at 94°C, 20 s at 60°C, and 45 s at 72°C. The last extension step was 5 min longer. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% D1 (Hispanlab) agarose gels with ethidium bromide staining (1 µg/mL), using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad).

Table 2. Lengths of fragments generated by digestion of 12S rRNA gene amplicons with the indicated restriction enzymes^a

Restriction enzyme	Chamois	Mouflon	Pyrenean ibex	Goat	Cattle	Sheep	Swine
<i>MseI</i>	407 ^b	407 ^b	396 ^b	397 ^b	379 ^b	407 ^b	586 ^b
	135 ^b	112 ^b	179 ^b	121 ^b	152 ^b	112 ^b	35
	55 ^b	71 ^b	36	57 ^b	55 ^b	71 ^b	32
	35	65 ^b	35	36	36	65 ^b	27
	35	23	23	35	35	23	24
	23	23	23	23	32	23	10
	11	7	11	23	23	7	
	11	4	9	11		4	
<i>ApoI</i>				9			
	507 ^b	412 ^b	616 ^b	616 ^b	616 ^b	412 ^b	712 ^b
	205 ^b	204 ^b	96 ^b	96 ^b	96 ^b	204 ^b	
		96 ^b				96 ^b	

^a *n* = 25 (number of individuals analyzed from each species).^b Visible DNA fragments in gel images.

Mitochondrial D-loop amplicons were subsequently purified and sequenced following the procedure described previously for the 12S rRNA PCR products. DLOOP-FW and DLOOP-REV oligonucleotides were used in the sequencing reactions.

Amplification and Sequencing of a DNA Fragment from Mouflon and Sheep Species

Alignment of mitochondrial D-loop sequences generated with DLOOP-FW/DLOOP-REV primers in chamois (AM 279274), pyrenean ibex (AM 279276), mouflon (AM 279279), sheep (AM 279282), cattle (AM 279287), goat (AM 279286), and swine (AM 279281) was performed using the EMBOSS software package. After analysis of the sequence alignment, a primer set was designed for the selective amplification of mouflon and sheep meat DNA using EMBOSS software package and Primer Express 2.0 software. This consisted of MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV oligonucleotides (Table 1), which were expected to yield a DNA fragment of about 370 bp in both ovine species.

Each PCR amplification (25 µL) was set containing 200 ng template DNA, 2 mM MgCl₂, 200 µM each dNTP, 10 pmol each MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV oligonucleotides, and 1 unit *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, and 0.001% BSA. The cycling conditions were as follows: 94°C for 3 min for denaturation, 40 cycles of amplification (94°C for 20 s, 64°C for 20 s, and 72°C for 45 s), and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining.

PCR products amplified from mouflon and sheep meat DNA were subsequently purified and sequenced as described

before, using MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV oligonucleotides in the sequencing reactions.

PCR-RFLP analysis.—Restriction maps of the 370 bp D-loop sequences obtained in mouflon and sheep with MSDLOOP primers were developed using the EMBOSS software package. The enzyme *MaeII* (New England Biolabs) was then selected as the potential candidate to undertake the differentiation of these 2 ovine meats by PCR-RFLP.

Each PCR amplicon of 8 µL was digested with 5 units of restriction *MaeII* endonuclease and 2 µL 10X digestion buffer recommended by the manufacturer, in a total volume of 20 µL at 37°C for 16 h. Subsequently, 10 µL of each PCR-RFLP reaction product was electrophoresed at 70 V on 3.5% MS8 (Hispanlab) for 90 min. A commercial standard (Biomarker Low) was used as size reference.

Results and Discussion

In the meat industry, there is a growing need to look for techniques that enable authentication and differentiation of certain game meat products which are targets of fraudulent description (4, 30). PCR-mediated analysis of mitochondrial DNA is the most common approach currently used for the identification of meat species. In particular, the PCR-RFLP technique is of special interest for meat speciation because it exploits the sequence variation that exists within defined mt DNA regions, allowing species differentiation by digestion of selected DNA fragments with appropriate restriction enzymes (15, 19, 26). We have developed a PCR-RFLP method based on mitochondrial DNA sequences for the identification of meats from chamois (*R. rupicapra*), pyrenean ibex (*C. pyrenaica*), and mouflon (*O. ammon*). The technique was also applied to the differentiation of these wild game

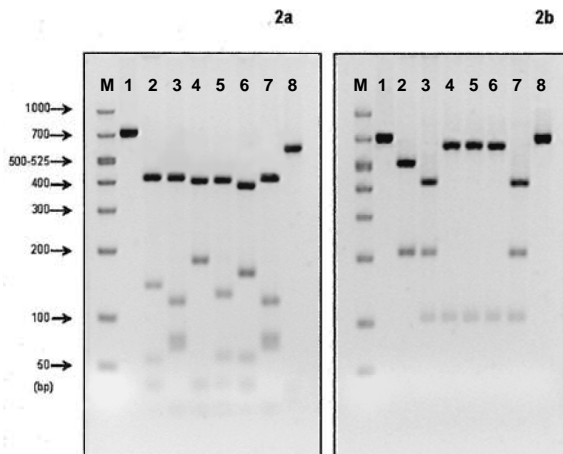


Figure 2. Electrophoretic analysis of the PCR-RFLP patterns obtained after digestion of 12S rRNA gene amplicons with *MseI* (2a) and *ApoI* (2b) endonucleases. Samples are (1) undigested PCR product; (2) chamois; (3) mouflon; (4) pyrenean ibex; (5) goat; (6) cattle; (7) sheep; and (8) swine. M = Molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker Low).

meats from those of cattle (*B. taurus*), sheep (*O. aries*), goat (*C. hircus*), and swine (*S. scrofa domestica*) species.

The mt 12S rRNA gene was used to identify and differentiate the meats from chamois, pyrenean ibex, mouflon/sheep, cattle, goat, and swine species. The mt D-loop region was also targeted to attempt discrimination between mouflon and sheep meats.

PCR-RFLP Differentiation of Chamois, Pyrenean Ibex, Mouflon/Sheep, Cattle, Goat, and Swine Meats on the Mitochondrial 12S rRNA Region

The mitochondrial 12S rRNA gene was selected as marker because it has an acceptable length and an adequate level of mutation, and there is a wide spectrum of sequences deposited in the databases (5). The mitochondrial primers 12S-FW and 12S-REV used in the PCR technique developed, successfully amplified a conserved 712 bp region from the 12S rRNA gene of all chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep, cattle, goat, and swine individuals analyzed (results not shown).

Following amplification, the use of PCR-RFLP analysis to identify the origin of an unknown sample may be possible thanks to the use of suitable restriction endonucleases. Because previous sequence map data from authentic specimens are needed to provide species-specific reference restriction patterns (3), 12S rRNA PCR products from various individuals of each selected meat species were sequenced, and restriction maps were obtained. After detailed analysis and comparison of the 12S rRNA sequence maps, *MseI* and *ApoI* endonucleases were selected as potential tools for meat identification (Figure 1). The 12S rRNA nucleotide sequences generated from the mouflon (*O. ammon*, AM 158317) and *O. aries* (AJ 885200), its domestic counterpart, were 100% identical, thus impeding the selection of any discriminating

endonuclease for these 2 closely related ovine species. The cleavage patterns predicted from sequence map analysis are indicated in Table 2.

Figure 2 shows the results obtained following restriction analysis of the 12S rRNA gene fragment from chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep, cattle, goat, and swine meats after incubation with *MseI* and *ApoI* endonucleases. As shown in Figure 2a, digestions performed with *MseI* endonuclease resulted in DNA fragments of different sizes, allowing discrimination among all the targeted species, with the exception of mouflon (line 3) and sheep (line 7). In accordance with their 12S rRNA sequence identity, mouflon and sheep yielded the same PCR-RFLP pattern, differentiable from the DNA profiles of the other meat species analyzed. A number of small DNA fragments resulting from *MseI* digestions could not be detected after electrophoresis of the samples. However, the cleavage bands visualized in the gel were enough and suitable to enable species discrimination.

Although digestions with *MseI* enzyme originated characteristic PCR-RFLP profiles for chamois, pyrenean ibex, mouflon/sheep, cattle, goat, and swine meats, the banding patterns generated in chamois and goat samples might appear similar in the electrophoresis image due to the length proximity of their DNA restriction bands (Figure 2a, lines 2 and 5). For this reason, a complementary endonuclease, *ApoI*, was chosen, which allowed the unambiguous differentiation between chamois and goat species (Figure 2b). The band sizes obtained by agarose gel electrophoresis after fragment cleavage with either *MseI* and *ApoI* endonucleases were in agreement with the expected sizes inferred from sequence analysis.

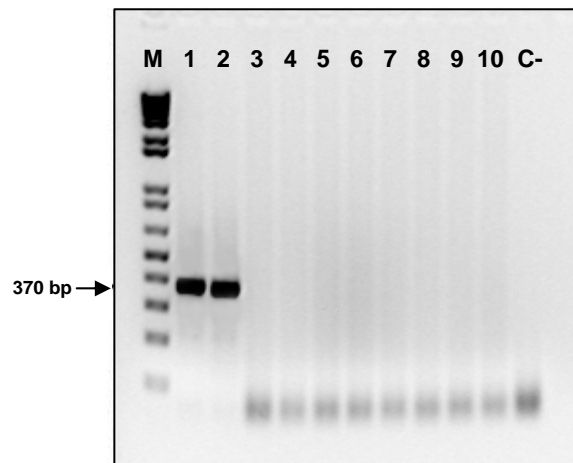


Figure 3. Electrophoretic analysis of the selective PCR amplification of a D-loop fragment from mouflon and sheep using MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV primers. Samples are (1) mouflon; (2) sheep; (3) chamois; (4) pyrenean ibex; (5) red deer; (6) fallow deer; (7) roe deer; (8) cattle; (9) goat; and (10) swine. M = Molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C- = Negative control.

One of the advantages of PCR-RFLP methodology is that it may allow species identification even when the number of polymorphisms among phylogenetically related species is too low to be detected by other genetic approaches (4, 23). In a previous work, a PCR-RFLP technique based on the mitochondrial 12S rRNA gene was successfully assayed for differentiation between closely related cervid meats (24). In the present study, although only 7 nucleotide positions of the 12S rRNA gene fragment were found to be different between the phylogenetically related pyrenean ibex (*C. pyrenaica*) and goat (*C. hircus*) species, their discrimination was successfully accomplished by the PCR-RFLP developed with *MseI* endonuclease. Twenty-five specimens from each species obtained from different origins were analyzed with *MseI* and *ApoI* enzymes, suggesting an adequate reproducibility of PCR-RFLP patterns.

However, it is important to mention that the applicability of the PCR-RFLP developed on the mitochondrial 12S rRNA fragment targeted in this study would be restricted in the analysis of samples subjected to DNA destructive processing, such as thermally treated meats. The thermal effect strongly accelerates DNA degradation from the samples and, consequently, amplification of particularly large DNA fragments such as 712 bp would be impeded. It should be also clarified that the PCR-RFLP technique developed herein

would not be appropriate for the analysis of admixed meats (sausages, pates, minced meat products, etc.) containing 2 or more species in their composition, because the use of the mammalian-conserved primers (12S-FW and 12S-REV) would result in PCR amplification of DNA from all the meat species present in the product. Therefore, the DNA fragments obtained after digestion of the PCR products would result in a combination of miscellaneous restriction patterns representing all of the possible species included in the adulterated sample. For this reason, the electrophoretic results obtained after PCR-RFLP analysis from such admixed/adulterated samples would be highly difficult to interpret (14, 23). In the analysis of food matrixes in which different meat species would be present or thermal action effects may degrade the DNA, PCR using specific primers targeting short DNA fragments may be used as an alternative technique to PCR-RFLP for species identification (5, 31).

Most of the studies published to date about game species identification by the PCR-RFLP technique rely on the use of cytochrome b gene included in the mitochondrial DNA. However, endonuclease selection is sometimes difficult due to the presence of intraspecific point mutations that can affect conserved enzymes restriction sites, and several endonucleases are often needed to discriminate between phylogenetically related species (2–4, 21). In the present

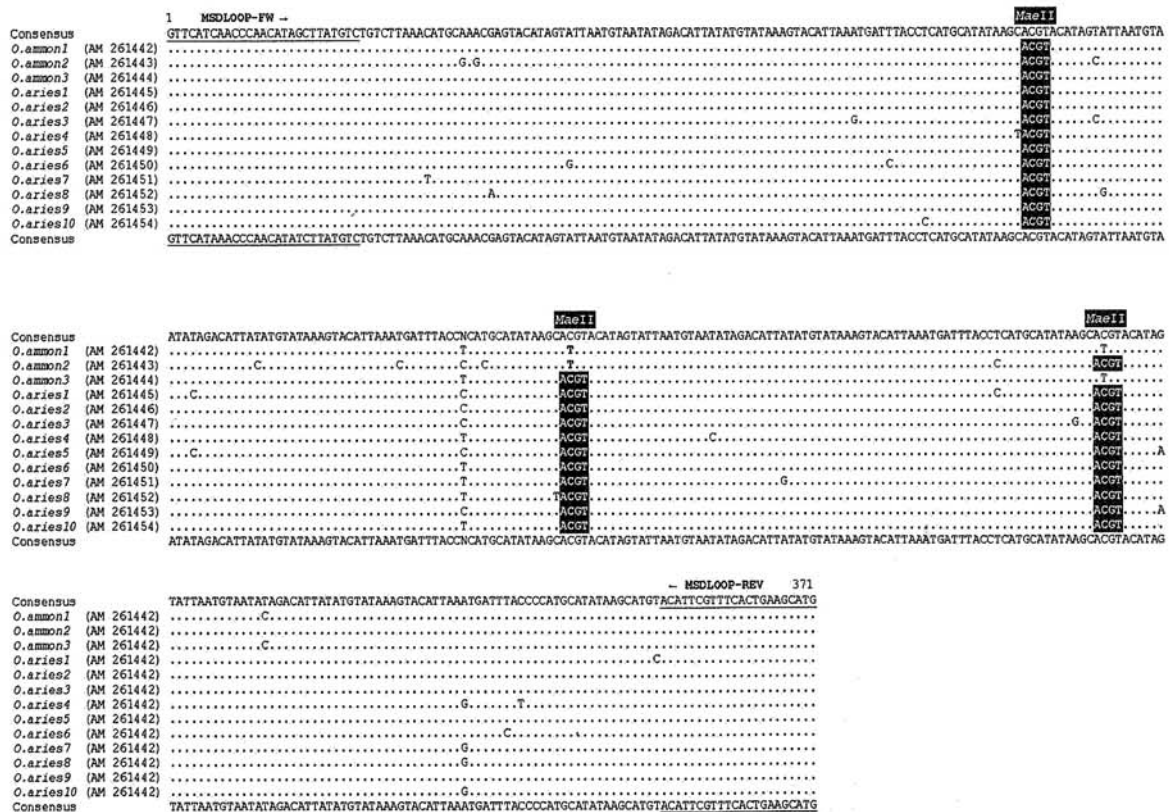


Figure 4. DNA sequence alignment of a D-loop fragment from mouflon (*O. ammon*) and sheep (*O. aries*). Restriction sites for *MaeII* (ACGT) are shown with shadow. Underlined nucleotides indicate the position of primers MSDLOOP-FW and MSDLOOP-REV used for PCR amplification.

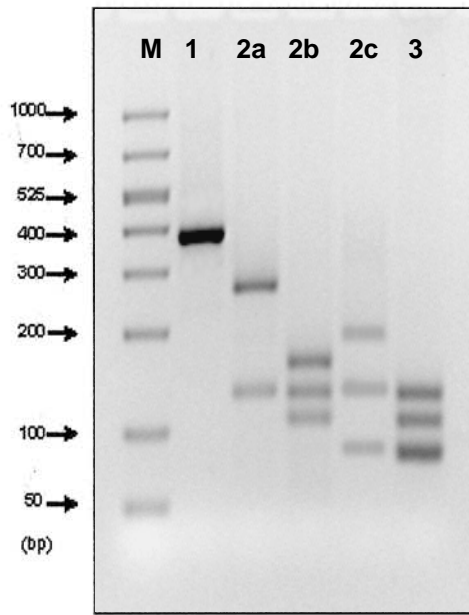


Figure 5. Electrophoretic analysis of the PCR-RFLP patterns obtained after digestion of D-loop amplicons with *MaeII* endonuclease. Samples are (1) undigested PCR product; (2a) mouflon RFLP pattern A; (2b) mouflon RFLP pattern B; (2c) mouflon RFLP pattern C; and (3) sheep RFLP pattern. M = Molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker Low).

study, PCR-RFLP analysis based on the mitochondrial 12S rRNA gene allowed unequivocal discrimination of chamois, pyrenean ibex, and mouflon/sheep meats, and their differentiation from meats of domestic cattle, goat, and swine species. However, because differentiation between mouflon and sheep was not feasible by means of this marker, the highly variable mitochondrial D-loop region was selected for further PCR-RFLP analysis on these 2 ovine meat species.

PCR-RFLP Differentiation of Mouflon and Sheep Meats on the Mitochondrial D-loop Region

To attempt the differentiation of meats from the phylogenetically close mouflon (*O. ammon*) and sheep (*O. aries*), a 370 bp mitochondrial D-loop fragment was selectively amplified from these 2 species, and subsequent restriction analysis of the amplicons was performed. The mitochondrial D-loop region was selected for this purpose because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome. The D-loop is included in the control region of the mt DNA and it is flanked by the tRNA-pro and tRNA-phe mt genes (32).

In order to compile enough nucleotide sequence data from the D-loop region of the 7 meat species analyzed in this study, DLOOP-FW and DLOOP-REV primers were designed to amplify a common DNA fragment from chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep, cattle, goat, and swine species. Bands obtained after PCR amplification ranged in size from 700 to

1000 bp, depending on the species (not shown), according to the finding that the control region is primarily responsible for the observed variation in length of the vertebrate mitochondrial genome (27, 29).

Sequencing and alignment of the D-loop amplicons obtained from each meat species with the common DLOOP oligonucleotides allowed the design of a primer pair (MSDLOOP-FW/MSDLOOP-REV) complementary to DNA sequences with sufficient species-to-species variability to enable the selective amplification of mouflon and sheep DNAs. As expected, this primer set amplified the 370 bp D-loop fragment from both ovine species, showing absence of any amplification signal when DNAs from other wild and domestic species were tested in the PCR (Figure 3).

After assessing the adequacy of mouflon/sheep PCR selective amplification, sequence polymorphism of the amplified D-loop fragments was examined in greater detail upon subjecting 10 individuals of each ovine species to DNA sequence analysis. As shown in Figure 4, the presence of a few nucleotide point mutations within mouflon and sheep individuals generated 3 D-loop sequence types for mouflon and 10 sequence types for sheep. In accordance to the D-loop restriction maps obtained, *MaeII* endonuclease was selected as the enzyme of choice for mouflon and sheep discrimination by the PCR-RFLP technique.

As shown in Figure 5, the existing sequence polymorphisms in mouflon and sheep D-loop regions gave rise to a single *MaeII* restriction profile unique to sheep meat, whereas 3 different electrophoretic patterns were obtained in mouflon samples. The fragments generated after digestion with *MaeII* endonuclease fitted in with the expected sizes shown in Table 3. It should be noted that PCR-RFLP patterns were reproducible after analysis of 36 individuals for each ovine species. Specifically, 73% of the analyzed mouflon individuals caused the RFLP type A, 25% yielded the type B, and only one individual originated RFLP type C (*O. ammon*; 3). Considering the hypothesis (33) that the mouflon (*O. ammon*) may be one of the original ancestors of the modern domestic sheep (*O. aries*), the applicability of the PCR-RFLP technique for mouflon and sheep differentiation might be hampered as a result of their phylogenetic proximity

Table 3. Lengths of fragments generated by digestion of D-loop amplicons with *MaeII* restriction enzyme^a

A (n' = 26)	Mouflon		Sheep
	B (n' = 9)	C (n' = 1)	
249	149	176	123
123	123	122	100
	100	75	75
			74

^a n = 36 (number of individuals analyzed from each species); n' = number of individuals yielding profiles A, B, or C.

and by the intraspecies mutations that can occur in a restriction site by chance, as reported by other authors (4, 25).

In conclusion, the PCR-RFLP assay developed in this work using the mitochondrial 12S rRNA gene provides a robust basis for discrimination among chamois, pyrenean ibex, and mouflon/sheep meats. The 12S rRNA restriction profiles obtained after the incubation with *MseI* and *ApoI* endonucleases allowed the unequivocal identification of all the analyzed species. However, because mouflon and sheep sequences are identical on the analyzed 12S rRNA fragment, PCR-RFLP targeting the highly variable D-loop region is proposed to distinguish between mouflon and sheep species. The D-loop PCR digestions with the selected *MaeII* enzyme yielded a single electrophoretic profile characteristic for sheep, whereas 3 different fragment patterns were obtained for mouflon meats. Although the results showed reproducibility of mouflon and sheep restriction patterns, exhaustive analysis on a higher number of individuals may be needed to avoid uncertainties in the PCR-RFLP profiles obtained. According to these results, the PCR-RFLP approaches reported in this work targeting mitochondrial DNA regions may offer a useful tool to reveal fraud in the substitution of game meat products, and could be used with confidence in inspection programs in order to verify the correct labeling of game species.

Acknowledgments

This study was supported by grant No. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia. Inés López-Calleja and Irene Martín are recipients of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We thank Santiago Lavin González (Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural "El Pardo") for kindly supplying game meat samples.

References

- (1) Di Pinto, A., Forte, V.T., Conversano, M.C., & Tantillo, G.M. (2005) *Food Control* **16**, 391–394
- (2) Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004) *Genetics* **5**, 30–34
- (3) Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., & Candrian, U. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 1542–1551
- (4) Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350–1355
- (5) Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P.E., & Martín, R. (2004) *J. Food Prot.* **67**, 172–177
- (6) Seyboldt, C., John, A., Mueffling, T.V., Nowak, B., & Wenzel, S. (2003) *J. Food Prot.* **66**, 644–651
- (7) Macedo-Silva, A., Barbosa, S.F.C., Alkmin, M.G.A., Vaz, A.J., Shimokomaki, M., & Tenuta-Filho, A. (2000) *Meat Sci.* **56**, 189–192
- (8) Renon, P., Bernardi, C., Scocca, S., Cantoni, C., & Gridavilla, G. (2003) *Ind. Aliment.* **42**, 496–500
- (9) Toorop, R.M., Murch, S.J., & Ball, R.O. (1997) *Food Res. Int.* **30**, 629–636
- (10) Meyer, R., & Candrian, U. (1996) *Lebensm. Wis. Technol.* **29**, 1–9
- (11) Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Rocalés, P., López-Pérez, M.J., & Pérez-Martos, A. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2829–2832
- (12) Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B.M., & Bhaskar, S. (2004) *Meat Sci.* **66**, 551–556
- (13) Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantón, C. (2004) *Meat Sci.* **66**, 753–755
- (14) Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000) *Meat Sci.* **54**, 369–376
- (15) Sun, Y.L., & Lin, C.S. (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1771–1776
- (16) Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M.T. (2004) *Mol. Cell. Probes* **18**, 81–87
- (17) Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.B., Chew, S.T., & Phang, S.T.W. (1998) *Meat Sci.* **48**, 275–285
- (18) Rea, S., Chikuni, K., & Avellini, P. (1996) *J. Food Sci.* **3**, 211–220
- (19) Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R., & Son, R. (2005) *Meat Sci.* **69**, 47–52
- (20) Brodmann, P.D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E.C. (2001) *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 491–496
- (21) Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., & Lenstra, J.A. (2002) *Meat Sci.* **60**, 365–369
- (22) Bottero, M.T., Dalmasso, I.A., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Gorla, M., & Civera, T. (2003) *J. Food Prot.* **66**, 2307–2312
- (23) Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M., & Sharma, B. (2005) *Meat Sci.* **70**, 107–112
- (24) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2006) *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1144–1150
- (25) Murray, B.W., McClymont, R.A., & Strobeck, C. (1995) *J. Forensic Sci.* **40**, 943–951
- (26) Krkoska, L., Nebola, M., Steinhäuserová, I., Obroská, I., & Ernst, M. (2003) *Fleischwirtschaft Int.* **2**, 39–42
- (27) Cozzi, M.C., Strillacci, M.G., Valiati, P., Bighignoli, B., Cancedda, M., & Zanotti, M. (2004) *Genet. Sel. Evol.* **36**, 663–672
- (28) Gao, H.W., Liang, C.Z., Zhang, Y.B., & Zhu, L.H. (2004) *J. AOAC Int.* **87**, 1195–1199
- (29) Lai, S.J., Liu, Y.P., Liu, Y.X., Li, X.W., & Yao, Y.G. (2006) *Mol. Phylogenet. Evol.* **38**, 146–154
- (30) Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., & Cantoni, C. (2002) *Meat Sci.* **61**, 291–294
- (31) Arslan, A., Ilhak, O.I., & Calicioglu, M. (2006) *Meat Sci.* **72**, 326–330
- (32) Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997) *Gene* **205**, 125–140
- (33) Hiendleder, S., Kaupe, B., Wasmuth, R., & Janke, A. (2002) *Proc. R. Soc. London* **269**, 893–904

Available online at www.sciencedirect.com

Meat Science 78 (2008) 314–322

MEAT
SCIENCEwww.elsevier.com/locate/meatsci

Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes

Violeta Fajardo, Isabel González *, Irene Martín, María Rojas, Pablo E. Hernández, Teresa García, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 20 March 2007; received in revised form 20 June 2007; accepted 23 June 2007

Abstract

This work describes the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR targeting sequences from two molecular markers: the mitochondrial displacement loop (D-loop) region and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene. A polymorphic D-loop fragment (~270 bp) was amplified and sequenced in a number of wild and domestic *Sus scrofa* meat samples, to find a nucleotide region suitable for PCR–RFLP analysis. Sequence data showed the presence of only a few point mutations across *Sus scrofa* D-loop sequences, not allowing direct discrimination between wild boar and domestic swine meats. Later, the *MC1R* gene was targeted and *Sus scrofa*-specific primers designed to amplify a 795 bp *MC1R* fragment. Subsequent RFLP analysis of the *MC1R* swine-specific amplicons allowed selection of BspHI and BstUI endonucleases to carry out intraspecific *Sus scrofa* differentiation. Digestion of *MC1R* amplicons with the chosen enzymes generated characteristic PCR–RFLP profiles that allowed discrimination among meats from wild and domestic swine specimens. The technique also enabled the detection of samples that yielded heterozygous profiles, suggesting hybrids resulting from wild boar and domestic pig breeding. The PCR–RFLP reported here, targeting the *MC1R* gene may be routinely applied to verify the correct labelling of game products.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: European wild boar; Domestic swine; D-loop; *MC1R* gene; PCR–RFLP

1. Introduction

Game meat is often a target for fraudulent labelling because producers may replace more expensive products by others of inferior quality (Pfeiffer, Burger, & Brenig, 2004; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999). The demand for wild boar meat is growing due to increasing interest by consumers in healthy and safe foods. Meat from wild boar is considered a delicacy and commands a high price compared to other meats because it has a characteristic and

intense flavour, is lower in fat and cholesterol, has high levels of polyunsaturated fatty acids and the animals are not treated with hormones or steroids (Brodmann, Nicholas, Schaltenbrand, & Ilg, 2001). For this reason, the substitution of wild boar meat by similar but cheaper meats such as domestic pork results in large profits for food manufactures and suppliers. To protect consumers and ensure meat traceability along the supply chain, rapid and reliable methods for species identification are needed (Krkoska, Nebola, Steinhäuserová, Obroská, & Ernst, 2003; Pascal & Mahé, 2001).

DNA techniques have become essential tools for species identification and are widely used (Teletchea, Maudet, &

* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.
E-mail address: gonzalzi@vet.ucm.es (I. González).

Hänni, 2005). In particular, the introduction of polymerase chain reaction (PCR) methodology in food analysis has provided a vast range of techniques for rapid detection and identification of organisms at species and intraspecies level (Girish et al., 2004; Meyer & Candrian, 1996). Among PCR-based approaches employed in the food industry to monitor adulterations of products of animal origin, one of the most frequently used is PCR amplification of marker gene fragment(s) with universal primers, coupled with techniques like nucleotide-sequencing (Colombo, Cardia, Renon, & Cantoni, 2004) or restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Brodmann et al., 2001; Pfeiffer et al., 2004). In particular, PCR–RFLP has special interest for meat speciation because it exploits the sequence variation that exists within defined DNA regions, allowing species differentiation of even closely related species by digestion of selected DNA fragments with appropriate restriction enzymes (Girish et al., 2005; Meyer, Hófelein, Lüthy, & Candrian, 1995).

Both nuclear and mitochondrial genes have been targeted for meat species identification by PCR–RFLP (Asensio et al., 2001; Fajardo et al., 2006, 2007; Hopwood, Fairbrother, Lockley, & Bardsley, 1999). Mitochondrial (mt) DNA is haploid, non-recombining, and is almost exclusively maternally inherited. The advantage of mitochondrial-based DNA analysis derives from the fact that there are many mitochondria per cell and many DNA molecules within each mitochondrion, making mt DNA a naturally amplified source of genetic variation (Fajardo et al., 2006; Girish et al., 2004). In addition, mitochondrial genes evolve much faster than nuclear genes and thus contain more sequence diversity, facilitating the identification of phylogenetically related species (Pfeiffer et al., 2004). However, a drawback of mt DNA markers is that because the mitochondrial genome is inherited maternally, hybrid animals possess only the genetic signature of their maternal parent. So, when cross-breeding takes place between species, mitochondrial data for meat species identification should be supplemented with studies based on biparentally inherited nuclear genes. Besides, since nuclear sequences accrue mutations at slower rates than mitochondrial ones, they are well suited to identify animal species relationships across large phylogenetic distances (Rodríguez et al., 2001).

This work is focused on the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis on sequences from both mitochondrial and nuclear markers: the mitochondrial displacement loop (D-loop) region and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MCR1*) gene.

2. Materials and methods

2.1. Selection of meat samples and DNA extraction

Muscle samples of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) were obtained from the Department of Animal

Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo” and Sierra de Madrid) and Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo). Domestic swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain).

Meats from other game and domestic species were also acquired for analysis. Red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) meats were obtained from the Department of Animal Pathology (Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz). Meats from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*) species were purchased from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain).

Each species were morphologically identified before the samples were obtained. Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20°C until use.

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described previously (Fajardo et al., 2006).

2.2. Analysis of the mitochondrial D-loop region

2.2.1. PCR and sequence analysis

Several sequences available in the Genbank/EMBL databank, including various mammal D-loop sequences obtained previously (Fajardo et al., 2007), were aligned and compared using the EMBOSS software package version 2.2.0. A set of conserved primers (MITDLOOP-FW: 5'-TACCATGCCGCGTGAAACCA-3' and MITDLOOP-REV: 5'-TGACGGCCATNGCTGAGTC-3') was then designed to amplify a D-loop fragment displaying the highest degree of nucleotide polymorphism among the aligned mammalian species. This set of primers was predicted to produce amplicons of approximately 270 bp in wild boar and domestic swine meats. EMBOSS software package version 2.2.0. and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster city, CA) were used for primer design.

PCR amplifications with MITDLOOP-FW/MITDLOOP-REV primers were performed in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK). Each reaction (25 μL) was set to contain 100 ng of template DNA, 2 mM MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 1 U of *Thermus thermophilus* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris–HCL, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.001% BSA. The cycling conditions were as follows: 94°C for 3 min for denaturation, 40 cycles of

amplification (94 °C for 20 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 45 s), and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products (10 µL) were mixed with 2 µL of gel loading solution and loaded in a 1.5% D1 agarose (Hispanlab, Torrejón, Spain) gel containing 1 µg/mL ethidium bromide in Tris–acetate buffer (0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 110 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Gel-doc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Mitochondrial ~270 bp D-loop amplicons obtained in several European wild boar and domestic swine specimens (15 of each) were purified and sequenced as described previously (Fajardo et al., 2007).

2.3. Analysis of the nuclear melanocortin receptor 1 gene (*MC1R*)

2.3.1. Amplification of a *Sus scrofa*-specific *MC1R* gene fragment

Alignment of several *MC1R* gene sequences found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database for wild boar, domestic swine, cattle and sheep species (Table 1) was achieved using the EMMA program included in the EMBOSS software package. After detailed examination of the sequence alignment, a primer set was designed for the selective amplification of wild boar and domestic swine meats, using EMBOSS software package and Primer Express 2.0 software. This consisted of *MC1R*-FW (5'-AGTGCCTGGAGGTGTCCATTCAC-3') and *MC1R*-REV (5'-CGTAGATGAGGGGGTC-CAGGATAGA-3') oligonucleotides, which were expected to yield a specific DNA fragment of 795 bp in all *Sus scrofa* individuals.

PCR amplification (25 µL) was performed using 150 ng of template DNA, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 10 pmol of each *MC1R*-FW and *MC1R*-REV primers, and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris–HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄ and 0.001% BSA. Amplifications were set with the following cycling conditions; an initial heat denaturation step at 94 °C for 10 min, 32 cycles of amplification (94 °C for 45 s, 61 °C for 20 s, and 72 °C for 45 s), and a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% D1 (Hispanlab) agarose gels with ethidium bromide staining.

2.3.2. PCR–RFLP analysis of the *Sus scrofa* *MC1R* gene fragment

Based on the *MC1R* sequences from the NCBI database, restriction maps were developed for wild boar and domestic swine. For this purpose, the sequence area including the primers *MC1R*-FW and *MC1R*-REV (795 bp), was subjected to the REMAP program included in the EMBOSS software package. After detailed comparison of the sequence maps two enzymes, BspHI and BstUI

Table 1

Accession numbers of the *MC1R* sequences used in this study

No.	Species	Latin name	Accession number	Breed
1	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	AY365254	Korean wild boar
2	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191184	Korean wild boar
3	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191185	Korean wild boar
4	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191186	Korean wild boar
5	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191187	Korean wild boar
6	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191188	Korean wild boar
7	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191189	Korean wild boar
8	Wild boar	<i>S. scrofa coreanus</i>	DQ191204	Korean wild boar
9	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY308993	Jinhua
10	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY365249	Berkshire
11	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY365250	Duroc
12	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY916524	Duroc
13	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY365251	Hampshire
14	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY365253	Landrace
15	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AY365255	Yorkshire
16	Domestic swine	<i>S. scrofa domestica</i>	AM231528	Not detailed
17	Cattle	<i>Bos taurus</i>	AF445642	Not detailed
18	Cattle	<i>Bos taurus</i>	NM_174108	Not detailed
19	Sheep	<i>Ovis aries</i>	DQ530056	Not detailed
20	Sheep	<i>Ovis aries</i>	DQ530057	Not detailed

(New England Biolabs, Beverly, Mass), were selected as potential candidates to undertake PCR–RFLP differentiation of meats from the wild and domestic subspecies of *Sus scrofa*.

Eight microliters of each PCR product were digested with 5 U of BspHI or BstUI restriction endonuclease and 2 µL of 10X digestion buffer recommended by the manufacturer, in a total volume of 20 µL at the appropriate temperature for each enzyme for 16 h. Subsequently, 10 µL of the PCR–RFLP reaction products were electrophoresed at 70 V on 3.5% MS8 agarose (Hispanlab) gel for 90 min. A commercial standard (Biomarker™ Low) was used as molecular weight marker.

2.3.3. Sequence analysis of the *Sus scrofa* *MC1R* gene fragment

Nuclear *MC1R* amplicons (795 bp) obtained in several European wild boar and domestic swine specimens were purified and sequenced as described previously (Fajardo et al., 2007).

3. Results and discussion

Because consumers want to be protected from falsely labelled meat products, many molecular techniques have been reported for food authentication in an effort to prevent fraud. Among DNA-based approaches, PCR–RFLP offers the advantages of being simpler, cheaper, and easily adaptable for routine large-scale studies such as those required in inspection programs (Brodmann et al., 2001; Meyer et al., 1995).

In first instance, the mt D-loop region was targeted to attempt differentiation of wild and domestic swine meats. Later, the nuclear gene encoding the melanocortin receptor 1 (MC1R) protein was considered as an alternative marker to discriminate between the two *Sus scrofa* meat types.

3.1. PCR analysis on the mitochondrial D-loop region

The mitochondrial D-loop region was initially selected to accomplish meat identification because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes, and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome. The D-loop is included in the control region of the mt DNA and is flanked by the tRNA^{Pro} and tRNA^{Phe} mt genes (Sbisà, Tanzariello, Reyes, Pesole, & Saccone, 1997).

Firstly, mitochondrial D-loop sequences already published for various mammal species were aligned and compared to find a polymorphic DNA region potentially suitable for further *Sus scrofa* intraspecific differentiation. For that purpose, a pair of primers (MITDLOOP-FW/MITDLOOP-REV) was designed to amplify a mt D-loop fragment (~270 bp) from wild boar and domestic swine meats and subsequent sequencing of the D-loop amplicons was carried out. As shown in Fig. 1, successful and constant amplification of the expected ~270 bp fragment was achieved when several wild boar and domestic swine meat samples were analyzed in the PCR.

Analysis of single nucleotide polymorphisms displayed by mt D-loop sequences has been shown to provide a convenient tool for species identification by PCR-based tech-

niques because mutations within a population of animals and between individuals are very frequent in this region (Murray, McClymont, & Strobeck, 1995). To achieve enough information about the degree of intraspecies sequence heterogeneity among the *Sus scrofa* D-loop fragment (~270 bp), 15 individual samples of each European wild boar and domestic swine were subjected to DNA sequence analysis. As shown in Fig. 2, only a few single nucleotide point mutations were present within *Sus scrofa* specimens, generating five and four D-loop sequence types for European wild boar and domestic swine, respectively. Detailed analysis of every D-loop sequence obtained indicated a lack of any diagnostic polymorphic nucleotide position that could enable direct differentiation between wild and domestic *Sus scrofa* meats. From the data obtained, it can be concluded that a PCR–RFLP technique based in the selected mt D-loop region cannot be used for direct identification between these two closely related porcine meats. These results are in agreement with other studies (Brodmann et al., 2001; Krkoska et al., 2003; Montiel-Sosa et al., 2000; Wolf et al., 1999) reporting that PCR–RFLP differentiation of wild and domestic swine meats based on mt D-loop sequences may be hampered as a result of their phylogenetically close relationship and by the chance intraspecies mutations that can occur in a restriction site. It is worth noting that approaches based on other PCR methods such as single strand conformation polymorphism (SSCP) have also been undertaken, without success, to discriminate domestic pig and wild boar meats (Rea, Chikuni, & Avellini, 1996).

As well as difficulties and controversy regarding the use of mitochondrial DNA markers for wild and domestic *Sus scrofa* differentiation (Krkoska et al., 2003; Montiel-Sosa et al., 2000), it should be noted that the maternal inheritance of mitochondrial DNA also restricts possible identification of heterozygous individuals resulting from breeding between wild boars and domestic swines (Kijas & Andersson, 2001; Krkoska et al., 2003). Consequently, other techniques or DNA polymorphic regions are needed.

3.2. PCR–RFLP differentiation of wild boar and domestic swine meats on the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) gene

In this work, the polymorphic nuclear gene encoding for the melanocortin receptor 1 (MC1R) was used as target to differentiate meats from European wild boar and domestic swine. For this purpose, PCR amplification of a *Sus scrofa* MC1R-specific DNA fragment followed by subsequent RFLP analysis of the amplified PCR products was carried out.

MC1R is a G-protein-coupled receptor involved in physiological variation in hair and skin color and is encoded by the classical extension (E) coat color locus. On the basis of the highly polymorphic nature of MC1R gene, and the close association between MC1R mutations and variations in coat color phenotypes, various studies

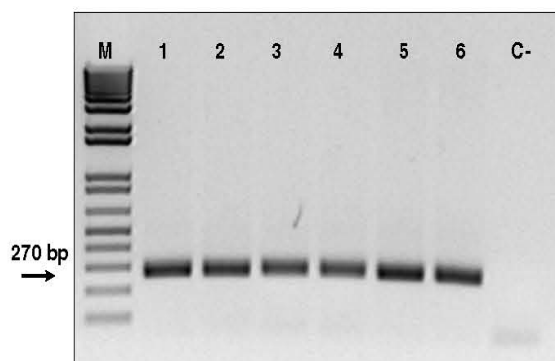


Fig. 1. Electrophoretic analysis of ~270 bp D-loop amplification products using MITDLOOP-FW and MITDLOOP-REV primers. Samples are meats from wild boar (1,2,3), and swine (4,5,6). M, molecular weight marker 1 kbp plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

		1	MITDLOOP-FW →	95
Consensus		<u>TACCATGCCGCTGA</u>AAACCAACCGCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAA		
Wild boar	1 (AM 420337)A.....		
Wild boar	2 (AM 420338)A.....		
Wild boar	3 (AM 420339)G.....A.....		
Wild boar	4 (AM 420335)A.....		
Wild boar	5 (AM 420336)T.....		
Domestic swine	1 (AM 420332)A.....		
Domestic swine	2 (AM 420331)A.....		
Domestic swine	3 (AM 420333)T.....C.....		
Domestic swine	4 (AM 420334)T.....		
Consensus		<u>TACCATGCCGCTGA</u>AAACCAACCGCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAA		
		96		190
Consensus		CAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGC		
Wild boar	1 (AM 420337)G.....		
Wild boar	2 (AM 420338)		
Wild boar	3 (AM 420339)		
Wild boar	4 (AM 420335)G.....		
Wild boar	5 (AM 420336)		
Domestic swine	1 (AM 420332)G.....		
Domestic swine	2 (AM 420331)		
Domestic swine	3 (AM 420333)T.....		
Domestic swine	4 (AM 420334)		
Consensus		CAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGC		
		191		271
Consensus		CCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTGGTATTTTAAATTTTGGGGATGCTTAGACTCAGCCATGGCCGTCA		
Wild boar	1 (AM 420337)		
Wild boar	2 (AM 420338)		
Wild boar	3 (AM 420339)		
Wild boar	4 (AM 420335)		
Wild boar	5 (AM 420336)		
Domestic swine	1 (AM 420332)		
Domestic swine	2 (AM 420331)		
Domestic swine	3 (AM 420333)G.....		
Domestic swine	4 (AM 420334)G.....		
Consensus		CCATGCTCACACATAACTGAGGTTTCATACATTGGTATTTTAAATTTTGGGGATGCTTAGACTCAGCCATGGCCGTCA		

Fig. 2. DNA sequence alignment of the different ~270 bp D-loop sequence types from domestic swine and wild boar. Bold-face type and underlined nucleotides indicate the position of primers MITDLOOP-FW and MITDLOOP-REV used for PCR amplification.

have proposed this gene as a useful tool for distinguishing breed features in a range of animal species including pig (Kijas et al., 1998), cattle (Klungland, Vage, Gomez-Raya, Adalsteinsson, & Lien, 1995), horse (Marklund, Moller, Sandberg, & Andersson, 1996), chicken (Takeuchi, Suzuki, Yabuuchi, & Takahashi, 1996) or sheep (Vage, Klungland, Lu, & Cone, 1999). In a study by Kijas et al. (1998), sequence analysis of the *MC1R* gene from several porcine breeds revealed distinct alleles associated with different pig color phenotypes. These authors suggest that wild boar specimens possess a unique *MC1R* receptor variant required for the expression of the wild-type coat color (denoted as allele E^+), which is absent among the major breeds of domestic pig. Based upon these premises, *MC1R* gene encoding the melanocortin stimulating hormone receptor was considered as a good alternative to mitochondrial markers for discrimination between European wild boar and domestic swine meats. Moreover, this nuclear marker may confer additional discriminatory applicability when pure wild boar meats are to be distinguished from meats of hybrids.

Firstly, *MC1R* sequences available in the NCBI database from various mammalian species including wild boar, domestic swine, cattle and sheep were aligned to search for a DNA region with sufficient species-to-species nucleotide differences to enable the design of a *Sus scrofa*-specific primer pair. The primers MC1R-FW/MC1R-REV amplified a 795 bp *MC1R* fragment from all the European wild boar

and domestic pig meats analyzed in this work (Fig. 3). As shown, no PCR amplification signal was attained when DNAs from other wild and domestic meat species such as red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon,

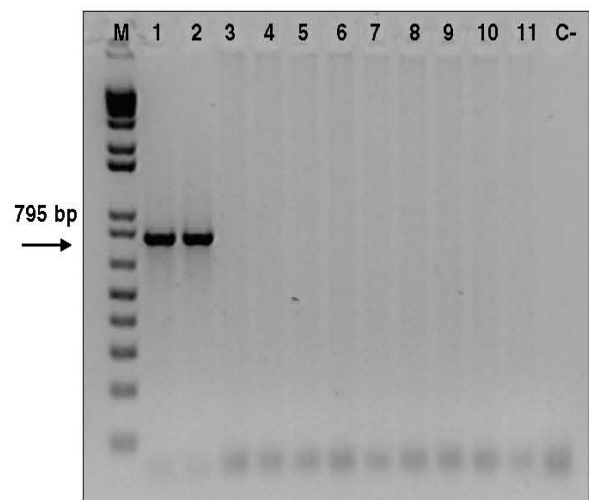


Fig. 3. Electrophoretic analysis of *Sus scrofa*-specific *MC1R* amplification products (795 bp) using MC1R-FW and MC1R-REV primers. Samples are meats from: (1) wild boar, (2) domestic swine, (3) red deer, (4) fallow deer, (5) roe deer, (6) chamois, (7) pyrenean ibex, (8) mouflon, (9) cattle, (10) sheep and (11) goat. M, molecular weight marker 1 kbp plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

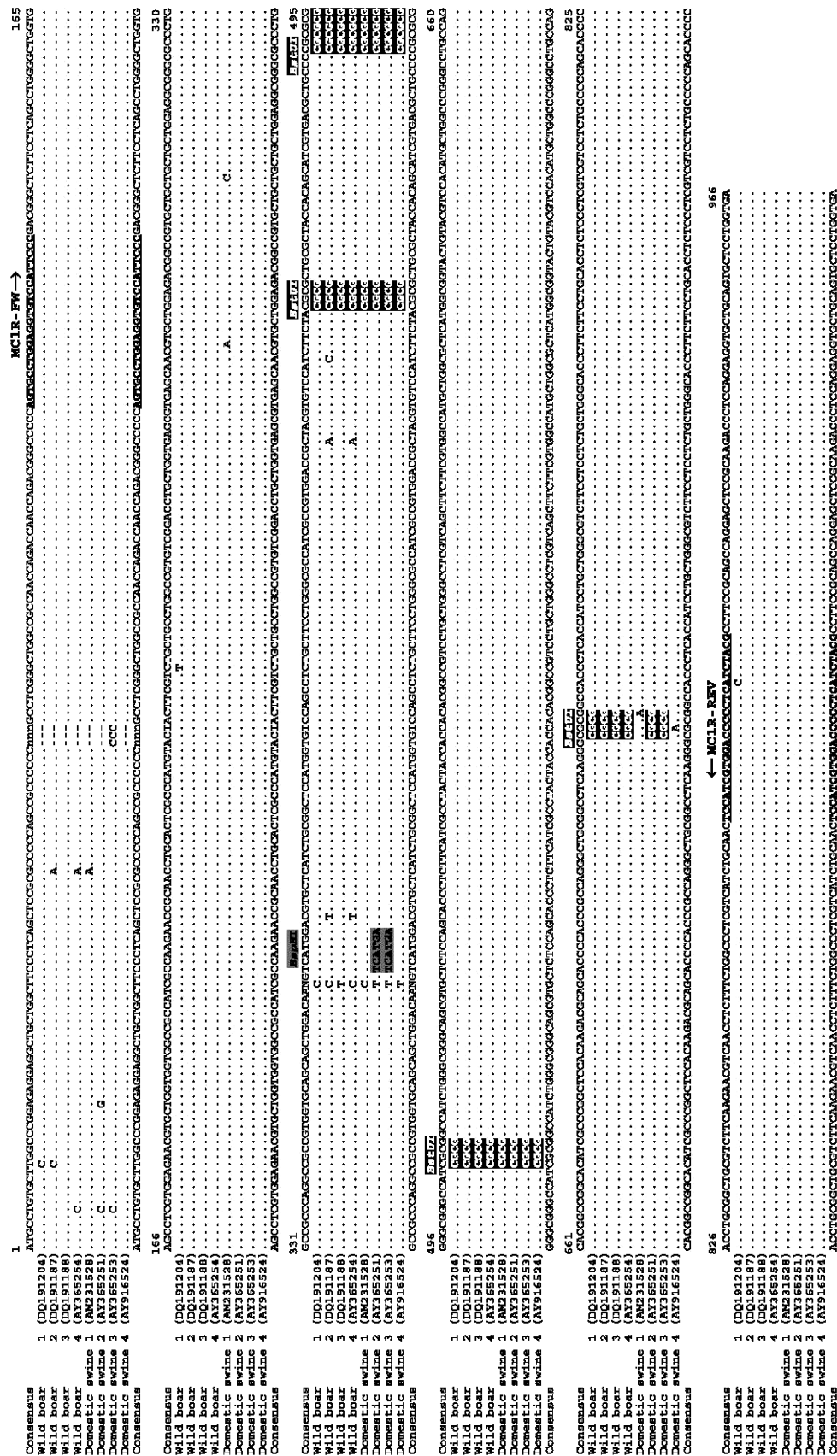


Fig. 4. DNA sequence alignment of *MC1R* gene from some of the wild boar and domestic swine specimens listed in Table 2. Eight representative *Sus scrofa* sequences are included in the alignment. Bold-face type and underlined nucleotides indicate the position of primers MC1R-FW and MC1R-REV used for PCR amplification. The region used for restriction analysis is shown with shadow. Restriction sites for BspHI (TCATGA) and BstUI (CGCG) enzymes are indicated.

Table 2

Lengths of fragments predicted from restriction analysis of porcine *MC1R* sequences with BspHI and BstUI endonucleases

	Wild boar	Domestic swine type A	Domestic swine type B
BspHI	795	539	795
		256	
BstUI	345	345	399
	222	222	345
	177	177	34
	34	34	15
	15	15	2
	2	2	

Profiles correspond to the following sequences listed in Table 1: wild boar (AY365254, AY520824, DQ191184, DQ191185, DQ191186, DQ191187, DQ191188, DQ191189, DQ191204), domestic swine type A (AY365249, AY365251, AY365253, AY365255), and domestic swine type B (AY916524, AY308993, AY365250, AM231528).

pyrean ibex, cattle, sheep, and goat were tested, confirming the specificity of the *Sus scrofa* primer set.

Following the *Sus scrofa*-specific PCR, restriction maps were obtained based on the various porcine *MC1R* sequences retrieved from the database. The few nucleotide differences detected across the *Sus scrofa* *MC1R* sequences flanked by the *MC1R* primers (795 bp in length), allowed the selection of two endonucleases, BspHI and BstUI, potentially adequate for discrimination between wild and domestic swine meats by the PCR–RFLP technique (Fig. 4). The cleavage patterns predicted for each endonuclease from the comparative mapping analysis are indicated in Table 2. As shown, a unique restriction pattern was expected for wild boar *MC1R* sequences, while two different profiles (A and B) were predicted for domestic swine samples. This information was in agreement with the sequence polymorphism data achieved in the *MC1R* gene by Kijas et al. (1998), revealing that wild boar and domestic pigs carry different alleles at the *MC1R*/E locus.

Based on these observations, *MC1R* amplicons obtained from 45 European wild boar and 45 domestic swine meat samples were subjected to BspHI and BstUI endonuclease digestions. As seen in Fig. 5, most of the wild boar samples analyzed (89%) were ascribed to the presumed wild boar unique PCR–RFLP profile consisting of an undigested fragment (795 bp) with BspHI (line 2) and three visible DNA fragments (345, 222, and 177 bp) from BstUI digestions (line 3). However, a different PCR–RFLP pattern was generated for the remaining 11% wild boar samples tested (five individuals), consisting in three DNA fragments of 795, 539, and 256 bp with BspHI (lane 8), and another three of 345, 222, and 177 bp with BstUI (lane 9). With respect to domestic swine meats, the majority of the samples (73%) were assigned to either type A or B of the predicted domestic swine profiles (lines 4–7), whereas the remaining 27% (12 samples) yielded another pattern consisting in three fragments of 795, 539, and 256 bp after BspI restriction (line 10) and four of 399, 345, 222, and 177 bp resulting from BstUI digestions (line 11). Summarizing, Fig. 5 shows two PCR–RFLP profiles obtained for wild

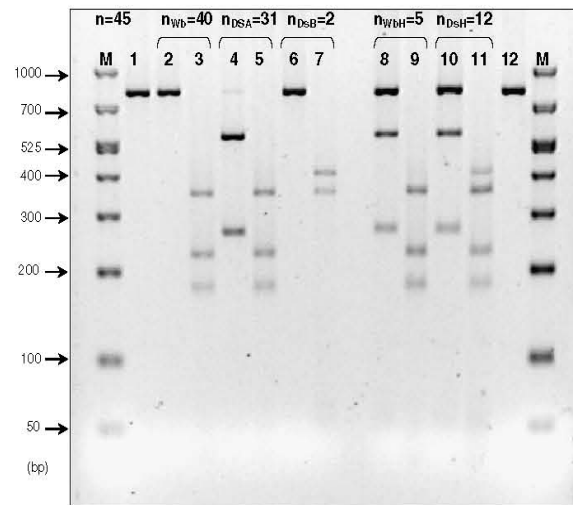


Fig. 5. Electrophoretic analysis of the PCR RFLP patterns obtained after digestion of *MC1R* amplicons with BspHI (lines 2, 4, 6, 8, 10) and BstUI (lines 3, 5, 7, 9, 11) endonucleases. Samples were ascribed to: pure wild boar (Wb, lines 2 and 3), domestic swine type A (DsA, lines 4 and 5), domestic swine type B (DsB, lines 6 and 7), wild boar hybrids (WbH, lines 8 and 9), and domestic swine hybrids (DsH, lines 10 and 11). Lanes 1 and 12 correspond to undigested PCR product. M, Molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker™ Low). n = total number of individuals analyzed from each wild boar and domestic swine; n_{Wb} , n_{DsA} , n_{DsB} , n_{WbH} , and n_{DsH} = number of individuals from each type yielding the different RFLP profiles.

boar meats (denoted as Wb and WbH), which are clearly differentiated from the three patterns obtained for domestic swine meats (DsA, DsB and DsH).

Visual examination of the DNA restriction fragment lengths resulting from digestions of wild boar and domestic swine type A meats, suggest that PCR products yielding the minority wild boar profile (WbH, lines 8 and 9) could be related with hybrid individuals resulting from crosses between wild boar and domestic swine, which is not uncommon in swine production systems. Wild boar hybrids bear the genetic information from both progenitors yielding heterozygous profiles differentiated from those of the purebred wild boars, with no domestic pig genes in their bloodline. In a similar way, it can be hypothesized from Fig. 5 that the domestic swine profile H (lines 10–11) sharing the DNA restriction bands predicted for both A and B swine types, may be a result of genetic crosses between different pig breeds.

To check these observations, various amplicons from each RFLP pattern were subjected to bi-directional sequence analysis with our *MC1R*-FW/*MC1R*-REV primers according to a previously described protocol (Fajardo et al., 2007). Detailed examination of the *MC1R* sequence chromatographs revealed the presence of single base substitutions at three diagnostic positions (373, 494, and 730 bp) affecting the restriction sites of either BspHI or BstUI endonucleases and giving rise to the characteristic PCR–RFLP profiles (Table 3). In particular, the three BspHI DNA fragments obtained in the suspected wild boar

Table 3
Diagnostic polymorphic sites affecting endonuclease restrictions and PCR RFLP profiles detected in the porcine *MC1R* sequences analyzed

Species	Accession number	Positions of diagnostic polymorphic sites			PCR RFLP profiles
		373	494	730	
Wild boar	AM492523	G	C	G	BspHI: 795 BstUI: 345, 222, 177, 34, 15, 2
Domestic swine A	AM492526	A	C	G	BspHI: 539, 256 BstUI: 345, 222, 177, 34, 15, 2
Domestic swine B	AM492528	G	T	A	BspHI: 795 BstUI: 399, 345, 34, 17
Wild boar H	AM492525	R	C	G	BspHI: 795, 539, 256 BstUI: 345, 222, 177, 34, 15, 2
Domestic swine H	AM492530	R	Y	R	BspHI: 795, 539, 256 BstUI: 399, 345, 222, 177, 34, 17, 15, 2

A representative individual of each *Sus scrofa* type is included. Bold-face type numbers indicate visible DNA fragments in gel images. R = G/A, Y = C/T.

hybrids (line 8) may be explained by the sequence dimorphism “G/A” encountered at nucleotide 373, which makes that BspHI enzyme cleave only one of the two dimorphic alleles bearing the endonuclease recognition site (causing fragments of 539 and 256 bp), whereas the other allele remains undigested (fragment of 795 bp). In the case of samples ascribed to domestic swine type H, three *MC1R* sequence dimorphisms were present (G/A, C/T and G/A at positions 373, 494 and 730, respectively) yielding the heterozygous PCR–RFLP profile described for these individuals (Table 3).

The results presented here show that the *MC1R* gene is a useful marker for distinguishing between meats from European wild boar and domestic swine. Moreover, this nuclear gene has the potential to discriminate meats from crossbred European wild boars liable to be marketed as derived from purebred European wild boar. The result of wild boar × domestic pig crosses are animals with the appearance of wild boar, but which yield paler and less flavoured meats similar to domestic pork rather than a wild boar product. Therefore, profitable fraud can occur when meat from such hybrid animals is sold as pure wild boar meat (Naya, Horiuchi, Ishiguro, & Shinagawa, 2003; Wolf et al., 1999).

4. Conclusion

The highly variable mitochondrial D-loop region does not allow development a PCR–RFLP technique for the intraspecific identification of wild and domestic *Sus scrofa* meats. In contrast, specific amplification of a *Sus scrofa* nuclear *MC1R* gene fragment, followed by restriction analysis of *MC1R* amplicons with BspHI and BstUI endonucle-

ases, does provide a valuable basis for the discrimination of wild boar and domestic swine, offering a useful tool to reveal fraud in the substitution of game meat products.

Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria* S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Irene Martín is recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavín González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

References

- Asensio, L., González, I., Fernández, A., Rodríguez, M. A., Lobo, E., Hernández, P. E., et al. (2001). Genetic differentiation between wreck fish (*Polyprius americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) by PCR RFLP analysis of an alpha-actin gene fragment. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 52, 131–134.
- Brodmann, P. D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E. C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology*, 212, 491–496.
- Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantoni, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. *Meat Science*, 66, 753–755.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, I., Pavón, M. A., et al. (2007). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Journal of AOAC International*, 90, 179–186.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., et al. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107–112.
- Hopwood, A. J., Fairbrother, K. S., Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science*, 53, 227–231.
- Kijas, J. M. H., & Andersson, L. (2001). A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *Journal of Molecular Evolution*, 52, 302–308.

- Kijas, J. H. M., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Mollet, M., & Andersson, L. (1998). Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, 150, 1177–1185.
- Klungland, H., Våge, D. I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S., & Lien, S. (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome*, 6, 636–639.
- Krkoska, L., Nebola, M., Steinhauserová, I., Obroská, I., & Ernst, M. (2003). Using the PCR RFLP method. *Fleischwirtschaft International*, 2, 39–42.
- Marklund, L., Møller, M. J., Sandberg, K., & Andersson, L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, 7, 895–899.
- Meyer, R., & Candrian, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technology*, 29, 1–9.
- Meyer, R., Hófelein, C., Lüthy, J., & Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, 78, 1542–1551.
- Montiel-Sosa, J. F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Rocalés, P., López-Pérez, M. J., & Pérez-Martos, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2829–2832.
- Murray, B. W., McClymont, R. A., & Strobeck, C. (1995). Forensic identification of ungulate species using restriction fragment digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *Journal of Forensic Science*, 40, 943–951.
- Naya, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (2003). Bacteriological and genetic assessment of game meat from Japanese wild boars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 345–349.
- Pascal, G., & Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology*, 47, 1329–1342.
- Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR RFLP. *Genetics*, 5, 30.
- Rea, S., Chikuni, K., & Avellini, P. (1996). Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig and wild boar meat samples. *Journal of Food Science*, 3, 211–220.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Fernández, A., Lobo, E., et al. (2001). Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* × *Cairina moschata*) in foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2717–2721.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 31, 125–140.
- Takeuchi, S., Suzuki, H., Yabuuchi, M., & Takahashi, S. (1996). A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1308, 164–168.
- Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnology*, 23, 359–366.
- Våge, D. I., Klungland, H., Lu, D., & Cone, R. D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome*, 10, 39–43.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.

Application of PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game and domestic meats

Violeta Fajardo¹, *Isabel González¹, John Dooley², Steve Garre², Helen M. Brow², Teresa García¹ and Rosario Martín¹

¹*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

²*Department of Biochemistry. Campden and Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, GL55 6LD, UK.*

Abstract

BACKGROUND: The objective of this study was to adapt and improve previously published PCR-RFLP methods aimed to the identification of game and domestic meats, by replacing the gel electrophoretic steps for DNA fragment analysis by a chip-based capillary electrophoresis system.

RESULTS: PCR amplification of a mitochondrial 12S rRNA gene fragment and subsequent digestions of the amplicons with either *MseI* or a combination of *MboII*, *BsII*, and *ApoI* endonucleases, generated characteristic PCR-RFLP profiles that allowed discrimination among ten relevant game and domestic meat species. The Agilent 2100 Bioanalyzer utilizes capillary electrophoresis on a microchip device that is capable of rapidly sizing DNA fragments offering a valuable recent development for the analysis of complex DNA banding patterns.

CONCLUSION: Results obtained in this work indicated that banding resolution on the system was sensitive, with detection of some small DNA fragments that were not observed with the published conventional PCR-RFLP gel-based method. Therefore, the new faster and easy handling procedure provides an additional powerful tool that can be employed for meat speciation.

Keywords: capillary electrophoresis; PCR-RFLP; game meat; 12S rRNA gene

INTRODUCTION

Game meat is an example of a susceptible target for fraudulent labeling due to the economic profit that results from selling cheaper meat as meat from more demanded and appreciated species.¹ To protect consumers and ensure meat traceability along the food supply chain, the development of reliable and simple tools for the unequivocal identification of meat from game species is required.^{2,3}

DNA-based assays have been well received for meat authentication because of the relative stability of the DNA molecule under extreme conditions and its efficient amplification by polymerase chain reaction amplification (PCR).⁴ Among DNA-based methods, PCR and RFLP mapping have been successfully adapted for the detection of food substitution and species identification.⁵⁻⁷

Although PCR-RFLP technique is useful for identification purposes, it relies on the use of gel electrophoresis and staining for endpoint detection. These strategies are potentially hazardous and time-consuming and may produce variable results in certain instances. To meet the demands of gene technology development, miniaturization of analytical and biological instruments have emerged rapidly in the past decades.⁸ The microchip-based capillary electrophoresis technology represents a valuable recent advance for the analysis of complex DNA banding patterns, in which the gel electrophoresis step is replaced by an automated LabChip electrophoretic system.⁹ The Agilent 2100 Bioanalyzer is the first commercially available device to utilize chip-based nucleic acid separation technology. The LabChip separates nucleic acid fragments by capillary electrophoresis in a microfluidic chip with microfabricated channels and automates the detection as well as on-line data evaluation.¹⁰

The objective of the present study was to make progress on the identification of different game and domestic meat species by assembling and adapting previous PCR-RFLP techniques developed on the mitochondrial 12S rRNA gene^{11,12} to the lab-on-a-chip capillary electrophoresis technology.

EXPERIMENTAL

Selection of Meat Samples and DNA Extraction

Authentic muscle samples of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Asturias, Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz). Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species was morphologically identified before the samples were obtained. Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20 °C until use.

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described in a previous work.¹¹ DNA concentration was estimated by UV absorption spectrophotometry at a wavelength of 260 nm.

PCR-RFLP and Lab-on-a-chip Analysis of Meat s From Game and Domestic Species on th e Mitochondrial 12S rRNA Region

PCR-RFLP

A conserved fragment of ~720 bp was amplified from meats of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, pyrenean ibex, goat, sheep, cattle, and swine species, and subsequent enzymatic digestions of the amplicons were carried out for meat differentiation. The details and conditions for PCR amplification and RFLP restrictions were those described in previous studies.^{11,12} In line with these works,

sequence mapping information obtained with the EMBOSS software package from every authentic meat specimen, allowed the adoption of two strategies to obtain species-specific reference restriction patterns: a) one-step use of *MseI* restriction endonuclease, and b) combination of three independent restriction reactions with *MboII*, *BsII* and *ApoI* enzymes.

Lab-on-a-chip Analysis of DNA Fragments

The visualization of fragment profiles generated through restriction digests was carried out using DNA1000 LabChips (Capiler Technologies, Mountain View, CA) with the Agilent 2100 capillary electrophoresis lab-on-a-chip system (Agilent Technologies Ltd., South Queensferry, UK). Reagents and DNA1000 LabChips were prepared following the manufacturer's instructions. Batches (~500 µL) of gel matrix (used to fill LabChip capillaries) were prepared as required. All reagents were stored at 4 °C when not in use and allowed to reach room temperature for 1 h before use. Digested PCR products (5 µL) were mixed with 1 µL of 60 mM EDTA prior to loading on to LabChips, to achieve a final concentration of 10 mM EDTA required to enzyme inactivation. Aliquots (1 µL) of the reaction mix were loaded on the LabChips following the manufacturer's instructions, and analyzed with the 2100 Bioanalyzer and with the 2100 Expert software. Fingerprints obtained for each meat species were compared to those reported previously using conventional gel electrophoretic separation methods.^{11,12}

RESULTS AND DISCUSSION

The definition of the species contained in a food product is a crucial step in the food quality control to avoid possible commercial frauds. In this case, it is very important to assess that species of high commercial value are not sold partially or entirely substituted with other species of lower commercial value.⁴ To detect such frauds, polymerase chain reaction (PCR) has been widely applied for the analysis of food components because of its simplicity, specificity and sensitivity.¹³ An extension of this technique that has gained acceptance among meat species identification methods relies on processing the PCR fragments with selected endonucleases to generate specific restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP).^{2,3,5,14} In previous studies, we reported PCR-RFLP based assays using conventional agarose gel detection for the identification of game meats from some wild *cervidae* and *caprinae* species and their differentiation from commercially important domestic meats.^{11,12} The objective of the present work was to compile the results of these works and to make a further progress in the existing PCR-RFLP approaches by using a chip-based capillary electrophoresis system for DNA fragment separation, detection and analysis. To analyze PCR-RFLP fingerprints, the new method uses the Agilent 2100 Bioanalyzer, which is a recent generation of capillary electrophoresis lab-on-a-chip devices, capable of rapidly sizing small DNA fragments.¹⁰

As it was previously evidenced, the mitochondrial primers 12S-FW and 12S-REV designed by us¹¹ amplified a conserved ~720 bp region from the 12S rRNA gene of all the species analyzed (results not shown). After amplification with the conserved primer pair, PCR-RFLP was applied to distinguish the species by means of the use of the *MseI*, as well as a combination of *MboII*, *BsII* and *ApoI* endonucleases.

The assay takes advantage of the observed 12S rRNA nucleotide variation among the different meat species included in the study.^{11,12}

Following cleavage of the conserved amplified 12S rRNA gene fragments with the chosen restriction enzymes, PCR-RFLP patterns were resolved using DNA1000 LabChips on the 2100 Bioanalyzer to confirm the presence of species-specific restriction profiles. The DNA1000 LabChip is reported to enable good discrimination of DNA fragments ranging from ~25 to 1000 bp, which are detected using a fluorescent DNA-binding dye and laser-induced fluorescence.^{10,15} Fragment sizing is achieved by comparison to DNA size markers.

Figure 1 is a computer-generated gel image using the 2100 Expert software, including the 12S rRNA gene fingerprints generated by the *MseI* endonuclease restrictions. As can be noticed, *MseI* patterns allow differentiation of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat and swine species. These results agree with antecedent findings,^{11,12} showing that the enzyme can be applied overall to the one-step differentiation of the ten analyzed meat species.

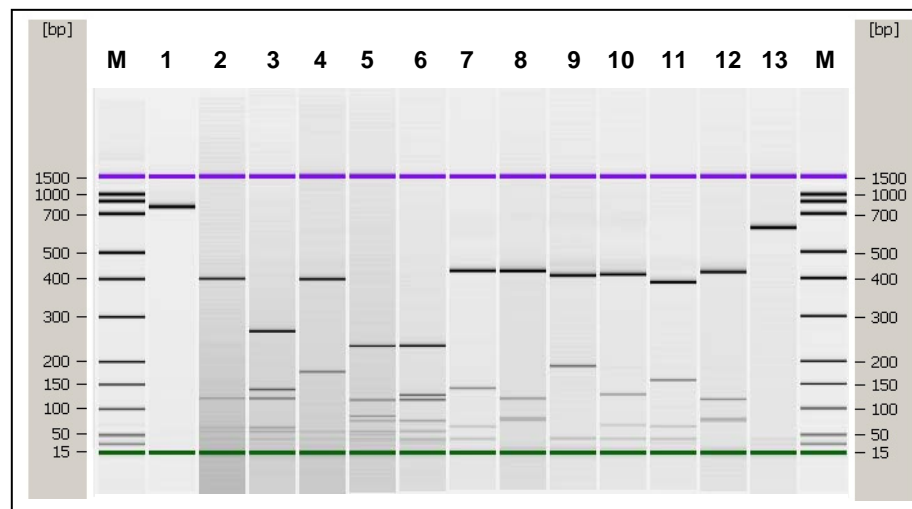


Figure 1. PCR-RFLP profiles generated by the Agilent 2100 Bioanalyzer from 12S rRNA gene PCR products digested with *MseI* endonuclease. Samples are: (1) undigested PCR product, (2, 3) red deer, (4) fallow deer, (5, 6) roe deer, (7) chamois, (8) mouflon, (9) pyrenean ibex, (10) goat, (11) cattle, (12) sheep, and (13) swine. L, Molecular weight marker.

Figure 2 shows the results obtained following restriction analysis of 12S PCR products from all the target species on the 2100 Bioanalyzer, after incubation of the DNAs with *MboII*, *BsII*, and *ApoI* endonucleases. As shown, the conserved cleavage sites present on the target sequences for the three enzymes generated a single and differentiable PCR-RFLP pattern for each of the analyzed species. These findings match with PCR-RFLP results of a previous study comprising the identification of *cervidae* and domestic meats.¹¹ Moreover, they add the advantageous feature to demonstrate the ability of the three selected endonucleases to differentiate the wild *cervidae*, *caprinae* and the domestic meat species when analyzed all together by the PCR-RFLP lab-on-a-chip technique.

Average sizes of the observed PCR-RFLP fragments following restriction analysis of 5 individuals of each of the species selected in this study is shown in Table 1. Some authors report that the Agilent Bioanalyzer 2100 showed difficulties in resolving DNA fragments smaller than ~ 35 bp, probably because they were too close to the sizing limits for the DNA1000 LabChip (estimated in 25 to 1000 bp) or did not fluorescence sufficiently to be detected.^{10,15} In this work, DNA fragments of 35-50 bp which could not be visualized previously in traditional agarose gels can be detected in some *MseI* digests (Fig. 1), highlighting the improved band resolution of this method in comparison to the conventional gel electrophoretic detection. However, it should be mentioned that the 2100 Expert software measured the DNA fragments with small differences with respect to the sizes reported by the mentioned conventional PCR-RFLP approach.^{11,12} These observations are in line with other works that also report minor variations (around 5%) among the predicted and the observed fragments when using the 2100 Expert software.¹⁵ In the present work, the largest observed difference between predicted and experimentally observed fragment sizes in the profiles generated by the Agilent 2100 Bioanalyzer was around 8%. Nevertheless, DNA sizing results remained consistent after analysing 5 individuals of each selected meat species, permitting their unfailing identification.

The results obtained herein show that the identification of the ten game and domestic meats studied using the Agilent 2100 Bioanalyzer is feasible, providing an improvement on PCR-RFLP fragment resolution and detection in comparison with the conventional gel-based method. The Agilent 2100 Bioanalyzer is designed to rapidly analyze DNA fragments of various sizes and has the potential to allow any laboratory to perform molecular analysis without the need for specialized electrophoresis and

Table 1. Average sizes of the PCR-RFLP fragments obtained following separation of DNA cleaved with *MseI*, *MboII*, *BsII*, and *ApoI* enzymes on DNA1000 LabChips using the Agilent Bioanalyzer 2100.

Species (n=5)*	<i>MseI</i>	<i>MboII</i>	<i>BsII</i>	<i>ApoI</i>
Red deer	399, 121, 64, 56, 39 269, 141, 122, 65, 57, 39	397, 340	232, 199, 136, 108, 99	599, 109, 76
Fallow deer	404, 179, 56 235, 119, 86, 77, 57, 39	515, 233	232, 197, 135, 107, 98	598, 109, 77
Roe deer	235, 127, 118, 77, 57, 38	396, 234, 108	320, 197, 136, 107	682, 79
Chamois	429, 142, 66, 38	397, 232, 109	316, 198, 135, 106	557, 216
Mouflon	429, 121, 81, 77, 21	393, 232, 109	321, 198, 133, 106	440, 220, 110
Pyrenean Ibex	412, 190, 39	394, 233, 107	254, 198, 134, 107, 79	662, 109
Goat	415, 129, 69, 39	398, 234, 107	254, 198, 134, 106, 80	667, 109
Cattle	393, 160, 67, 39	396, 232, 106	320, 197, 136, 106	670, 109
Sheep	430, 121, 82, 79	394, 233, 109	321, 198, 134, 107	440, 219, 109
Swine	631, 38	385, 317	323, 191, 129, 106	751

*n = number of individuals analyzed from each species

Standard deviation obtained for each species was less than 1%

photography equipment.⁹ Using the DNA100 LabChip, up to 12 samples can be tested in a single run, usually taking 1 to 2 hours from start to finish, including postanalysis. Furthermore, the manipulation of the plastic chips is easier and less harmful compared to conventional gels which require handling during the DNA staining and detection stages.^{15,16} Owing to its advantages, the lab-on-a-chip system can provide ease standardization of DNA profiling between laboratories and it seems advantageous for routine species identification in inspection programs destined to enforce labeling regulation of meat products.

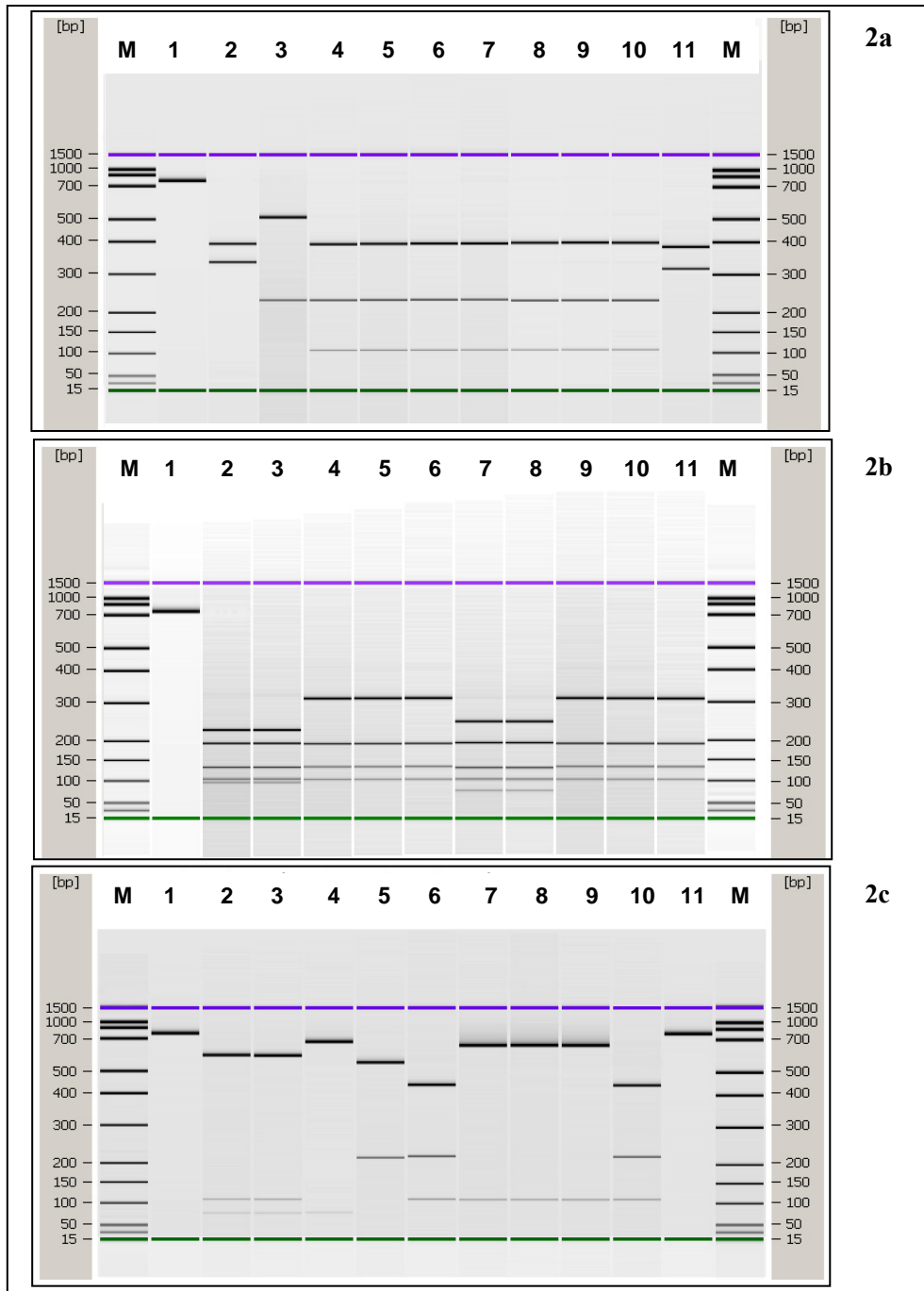


Figure 2. PCR-RFLP profiles generated by the Agilent 2100 Bioanalyzer from 12S rRNA gene PCR products digested with *MboII* (2a), *BsiII* (2b) and *ApoI* (2c) endonucleases. Samples are: (1) undigested PCR product, (2) red deer, (3) fallow deer, (4) roe deer, (5) chamois, (6) mouflon, (7) pyrenean ibex, (8) goat, (9) cattle, (10) sheep, and (11) swine. L, Molecular weight marker.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants no. AGL2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria* S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). Violeta Fajardo is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We are grateful to the Department of Biochemistry of CCFRA (Campden and Chorleywood Food Research Association, UK), from for giving us the opportunity to use their equipments and for their help in carrying out the experiments.

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), Mr. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Mr. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and Mrs. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

REFERENCES

1. Brodmann PD, Nicholas G, Schaltenbrand P and Ilg EC. Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *Eur Food Res Technol* **212**:491-496 (2001).
2. Wolf C, Rentsch J and Hübner P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J Agric Food Chem* **47**:1350-1355 (1999).
3. Pfeiffer I, Burger J and Brenig B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. *Genetics* **5**:30-35 (2004).
4. Woolfe M and Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol* **22**:222-226 (2004).
5. Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T and Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci* **54**:369-376 (2000).
6. Saini M, Das DK, Dhara A, Swarup D, Yadav MP and Gupta PK. Characterisation of peacock (*Pavo cristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. *British Poultry Sci* **48**:162-166 (2007).
7. Abdel-Rahman SM and Ahmed MMM. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. *Food Control* **18**:1246-1249 (2007).
8. Dolnik V, Liu S and Jovanvich S. Capillary electrophoresis on microchip. *Electrophoresis* **21**:41-54 (2000).
9. Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ and Wilding P. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clin Chem* **46**:1851-1853 (2000).
10. Nachamkin I, Panaro NJ, Li M, Ung H, Yuen PK, Kricka LJ and Wilding P. Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J Clin Microbiol* **39**:754-757 (2001).
11. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Hernández PE, García T and Martín R. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *J Agric Food Chem* **54**:1144-1150 (2006).
12. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T and Martín R. Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *J AOAC Int* **90**:179-196 (2007).
13. Teletchea F, Maudet C and Hänni C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnol* **23**:359-366 (2005).
14. Sun YL and Lin CS. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats. *J Agric Food Chem* **51**:1771-1776 (2003).
15. Dooley JJ, Sage HD, Clarke ML, Brown HH and Garrett SD. Fish Species Identification Using PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study. *J Agric Food Chem* **53**:3348-3357 (2005a).
16. Dooley JJ, Garrett SD and Brown HH. Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control* **16**:601-607 (2005b).

III.1. AUTHENTICATION OF GAME MEATS BY GENETIC TECHNIQUES

III.1.2. PCR USING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS

- Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science** 2007, 76, 234-240.
- PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop. **Meat Science** 2007, 76, 644-652.



Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene

V. Fajardo, I. González *, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, P.E. Hernández, T. García, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 16 February 2006; received in revised form 29 September 2006; accepted 10 November 2006

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) based on oligonucleotide primers targeting the mitochondrial 12S rRNA gene was applied to the specific identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*). The use of a common reverse primer, together with forward specific primers for red deer, fallow deer, and roe deer, allowed the selective amplification of the desired cervid sequences. The specificity of each primer pair was verified by PCR analysis of DNA from various game and domestic meats. The assay can be useful for the accurate identification of meats from cervid species, avoiding mislabeling or fraudulent species substitution in meat products.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Game meat; 12S rRNA gene; Polymerase chain reaction (PCR); Species-specific primers

1. Introduction

Determining the species origin of meat is an integral part of food regulatory control with respect to economic fraudulence. For example, game meat products are often a target for fraudulent labeling, because of the different prices between game and other meat species (Brodmann, Nicholas, Schaltenbrand, & Ilg, 2001; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999). Apart from the possible economic loss, correct species identification is important to the consumer for other reasons such as medical requirements of individuals who may have specific food allergies, or religious dietary restrictions. To detect such frauds and protect consumers, the development of reliable and simple tools which facilitates

routine control throughout the food chain is required (Verkaar, Nijman, Boutaga, & Lenstra, 2002).

Most analytical methods for meat species identification are based on the analysis of proteins by either electrophoretic (Vallejo, González, Mazorra, & Rodríguez, 2005), chromatographic (Ashoor, Monte, & Stiles, 1988; Toorop, Murch, & Ball, 1997), or immunochemical assays (Chen & Hsieh, 2000). However, most proteins suffer denaturation in heated products, resulting in changed antigenicity and electrophoretic mobility of molecules (Giovannacci et al., 2004).

Methods for meat identification are also based on DNA analysis. In comparison with protein-based techniques, DNA-based ones have proved to be more reliable because DNA is more stable under conditions associated with the high temperatures, pressures, and chemical treatments used in the preparation of some food products (Arslan, Ilhak, & Calicioglu, 2006; Frezza et al., 2003). In particular, the

* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.
E-mail address: gonzalzi@vet.ucm.es (I. González).

introduction of Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology in food analysis has provided a vast range of techniques for rapid detection and identification of organisms at species and intraspecies level. The main advantage of PCR is its high power of sensitivity and specificity, permitting a million-fold increase of the starting template target fragment (Chikuni, Tabata, Kosugiyama, Monma, & Saito, 1994). Among PCR-based techniques employed in the food industry to monitor adulterations of products from animal origin, the most frequently used are: (i) PCR amplification of marker gene fragment(s) with universal primers, coupled with techniques like nucleotide-sequencing or restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Colombo, Cardia, Renon, & Cantoni, 2004; Girish et al., 2004, 2005); and (ii) PCR amplification with species-specific primers (Hird, Goodier, & Hill, 2003; Matsunaga et al., 1999). PCR using specific primers can selectively detect DNA sequences from a food matrix and offers the advantages of being less expensive, and more useful for routine analysis of large numbers of samples (Herman, 2001).

The increasing trend towards reducing the fat content in the diet has led to increased interest in consuming meats from game species. Particularly, venison is becoming more and more popular in European markets, with red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) the three main species demanded by consumers. In this paper, we describe a method for the specific identification of meats from red deer, fallow deer, and roe deer, based on selective PCR amplification of DNA fragments on the mitochondrial 12S rRNA gene.

2. Materials and methods

2.1. Selection of meat samples

Authentic muscle samples of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting plants of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz).

Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), swine (*Sus scrofa domestica*), horse (*Equus caballus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), duck (*Cairina moschata*), turkey (*Meleagris gallipavo*), chicken (*Gallus gallus*), and goose (*Anser anser*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species were morphologically identified before the samples were obtained.

Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20°C until use. Red deer, fallow deer and roe deer meats were also analyzed after being subjected to experimental pasteurization (72°C for 30 min) and sterilization (121°C for 20 min) treatments.

Several dry-cured (ham and sausage) and cooked meat products from red deer, fallow deer, and roe deer species purchased from different retail markets were also included in the analysis.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard[®] DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described in previous work (Fajardo et al., 2006).

The DNA extracted from raw and processed tissues was electrophoresed in a 1% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. Genomic DNA was visualized by UV transillumination using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.3. Design of deer-specific primers and PCR amplification of the selected DNA fragments from red deer, fallow deer, and roe deer meats

Amplification and sequencing of a conserved 12S rRNA gene fragment ($\sim 720\text{ bp}$) from red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine meats was accomplished following a previously described procedure (Fajardo et al., 2006). The set of primers used for this purpose were: 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides (Table 1).

Alignment of 12S rRNA gene sequences obtained from red deer (AJ 885204, AJ 885205, AJ 885206), fallow deer (AJ 885203), roe deer (AJ 885202, AJ 972679, AJ 972680,

Table 1
DNA sequences of the primers used in this study

Primers	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description
12S-FW	20	GGTAAATCTCGTGCCAGCCA	Conserved forward primer (for sequencing)
12S-REV	25	TCCAGTATGCTTACCTTGTTAGGAC	Conserved reverse primer (for sequencing)
12SCE-FW	32	CAAAAACATATAACGAAAGTAACCTTCGGACC	Red deer specific forward primer
12SDD-FW	24	TAAACAACGAAGGTAACCTTATCG	Fallow deer specific forward primer
12SCC-FW	32	TGAAAATAGATAACGAAAGTAGCTTTGAACTA	Roe deer specific forward primer
12SCERV-REV	19	AAAGCACCGCCAAGTCCTT	Common reverse primer

AJ 972681, AJ 972682, AJ 972683), chamois (AM 158314), mouflon (AM 158317), pyrenean ibex (AM 158313), cattle (AJ 885201), sheep (AJ 885200), goat (AJ 885199), and swine (AM 158316) was performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. Specific primers for red deer, fallow deer and roe deer species were then designed based upon detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences. These consisted of a reverse primer (12SCERV-REV) common to all targeted species, and three forward species-specific primers: 12SCE-FW for red deer, 12SDD-FW for fallow deer and 12SCC-FW for roe deer (Table 1). The combination of each forward primer, along with the common reverse oligonucleotide, was expected to yield DNA fragments of ~170–175 bp in the 12S rRNA gene from each deer species.

DNA amplifications were carried out in a final volume of 25 µl containing 150–200 ng of template DNA, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 1 unit of *T*th DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂ SO₄, and 0.001% bovine serum albumin (BSA). Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 93 °C for 30 s, primer annealing at 61 °C (for fallow deer), 64 °C (for roe deer) or 67 °C (for red deer) for 30 s, and primer extension at 72 °C for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at 93 °C for 2 min was carried out to improve the final result.

PCR products (10 µl) were electrophoresed in a 2% D1 (Hispanlab) agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad).

3. Results and discussion

Because consumers want to be protected from falsely labeled meat products, various techniques have been reported for species identification in an effort to prevent such fraudulent actions (Herman, 2001; Koh, Lim, Chua, Chew, & Phang, 1998). Among them, molecular techniques, particularly polymerase chain reaction (PCR), has proven highly useful in tracing the species origin in food (Colgan et al., 2001). This paper reports a PCR method for the specific identification of meats from red deer (*C. elaphus*), fallow deer (*D. dama*), and roe deer (*C. capreolus*) based on selective amplification of sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene.

Mitochondrial DNA has been used widely as a marker in species identification (Girish et al., 2004; Wolf et al., 1999). Using an appropriate primer pairs, mitochondrial sequences have been amplified in many species, and the resulting differences used for species identification (Di Pinto, Forte, Conversano, & Tantillo, 2005; Herman,

2001). The mitochondrial encoded gene for 12S rRNA was selected in this work for meat species identification because it has an adequate length and grade of mutation, exhibiting a typical mosaic structure of phylogenetically conserved and variable regions (Cronin, 1992). As shown in Fig. 1, the mitochondrial conserved primers (12S-FW and 12S-REV) used in the PCR technique developed in this work, consistently amplified a 12S rRNA gene fragment of ~720 bp from meats of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine species.

On the basis of multispecies sequence comparison, species-specific PCR assays can be successfully developed to control food authenticity, because a target sequence can be amplified very sensitively in a pool of sequences of diverse sources (Colombo, Marchisio, Pizzini, & Cantoni, 2002). Following PCR amplification with the 12S conserved primers, amplicons from at least 11 individuals from each of red deer, fallow deer, and roe deer species were sequenced and aligned in order to search for a DNA segment with sufficient species-to-species variation to enable their discrimination. Moreover, to establish and assess a wider spectrum of PCR specificity, 12S rRNA gene sequences generated from other game and domestic species such as chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine were also included in the alignment. The information recorded after detailed study of the sequence multialignment permitted the design of specific forward primers for red deer, fallow deer, and roe deer species (12SCE-FW, 12SDD-FW, 12SCC-FW, respectively), and a reverse primer (12SCERV-REV) common to all selected species (Fig. 2). As shown in the figure, the consensus sequence was used in the case of red deer and roe deer alignment. In each of these two species, the presence of a few intraspecific nucleotide polymorphisms (from 2 to 8) gave rise to more than one 12S rRNA gene sequence type, although it should be noted that these punctual mutations did not affect the matching of the primers to the template DNA sequences.

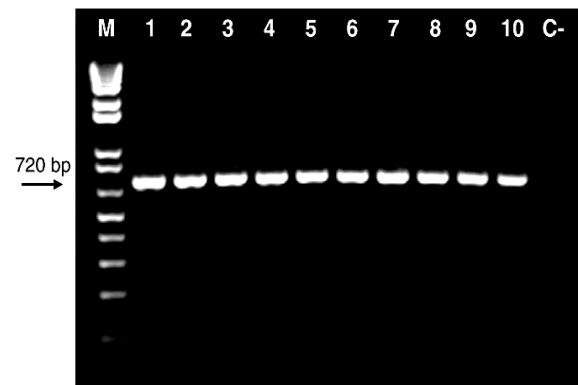


Fig. 1. Electrophoretic analysis of the conserved 12S rRNA gene PCR products obtained from (1) red deer, (2) fallow deer, (3) roe deer, (4) chamois, (5) mouflon, (6) pyrenean ibex, (7) cattle, (8) sheep, (9) goat, and (10) swine using 12S-FW and 12S-REV primers. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

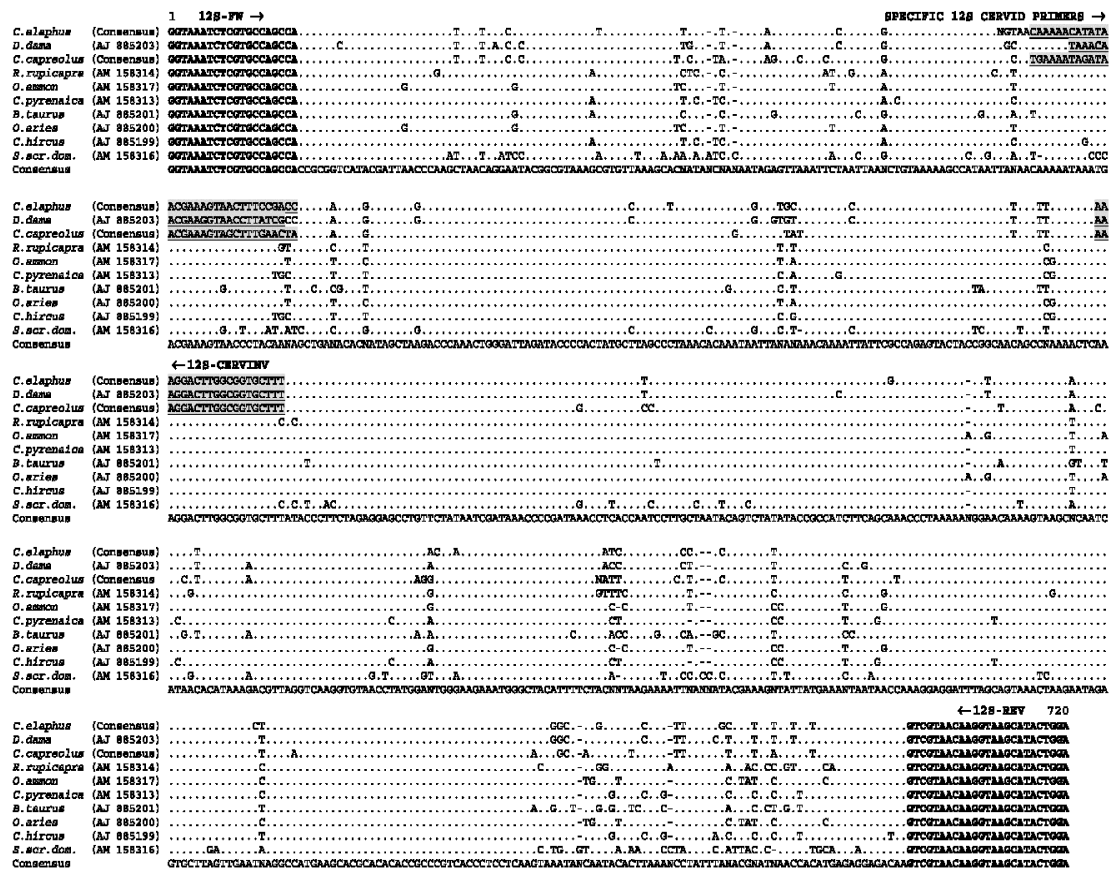


Fig. 2. DNA sequence alignment of the 12S rRNA gene PCR products from red deer (*C. elaphus*, consensus of: AJ 885204, AJ 885205, and AJ 885206), fallow deer (*D. dama*; AJ 885203), roe deer (*C. capreolus*, consensus of: AJ 885202, AJ 972679, AJ 972680, AJ 972681, AJ 972682, and AJ 972683), chamois (*R. rupicapra*; AM 158134), mouflon (*O. ammon*; AM 158317), pyrenean ibex (*C. pyrenaica*; AM 158313), cattle (*B. taurus*; AJ 885201), sheep (*O. aries*; AJ 885200), goat (*C. hircus*; AJ 885199), and swine (*S. scrofa domestica*; AM 158316). Boldfaced nucleotides indicate the position of primers 12S-FW and 12S-REV used for sequencing. Primers 12S-CE, 12S-DD, 12S-CC, and 12S-CERVINV are underlined and shaded.

Results of PCR amplifications indicated that the size of the amplicons obtained with the three deer-specific primer pairs were as expected from sequence analysis. As can be seen in Fig. 3, red deer forward oligonucleotide (12SCF-FW), together with the reverse common primer (12SCERV-REV) amplified successfully the 175 bp DNA fragment from red deer meat, whereas no amplification products were obtained with DNA from fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, cattle, sheep, goat, and swine meat samples (Fig. 3a). Similarly, the 12SDD-FW/12SCERV-REV primer pair amplified a fragment of 169 bp in samples from fallow deer meat, showing no amplification on DNA from the rest of the meat species analyzed (Fig. 3b). Finally, DNA from roe deer was successfully amplified with the roe deer primer set 12SCC-FW/12SCERV-REV, generating a specific fragment of 175 bp unique to this species (Fig. 3c). Twenty specimens from every selected meat species obtained from different origins were analyzed in the PCR assays, yielding consistent and reproducible DNA amplifications. The deer-specific primer pairs were also challenged with DNA from other commercially important meat species like rabbit, duck, turkey, chicken, goose, and horse, showing absence of any amplification signal in

the PCR (results not shown). These results suggest an optimum specificity of the three deer primer pairs when tested for PCR amplification against a number of game and domestic meat species for human consumption.

Besides primer specificity, it is known that a critical factor in PCR analysis is represented by heat denaturation of DNA subsequent to the processing treatments applied in some meat products. DNA degradation has shown to cause failures in PCR protocols, mainly when the fragments to be amplified are too large (Frezza et al., 2003; Matsunaga et al., 1999). In this context, PCR assays of food matrices in which thermal effects or other preservation treatments may degrade the food tissue DNA, should rely preferably on primers targeting short DNA fragments (Rodríguez et al., 2004).

To determine the influence of processing treatments on the suitability of the PCR method developed, DNA extracted from experimentally pasteurized (72 °C for 30 min) and sterilized (121 °C for 20 min) deer meats was assayed under the amplification conditions described in this work. As can be appreciated in Fig. 4, DNA extracted from the deer heat-treated meats exhibits a typical smear pattern of nucleic acid degradation, whereas DNA of raw meat

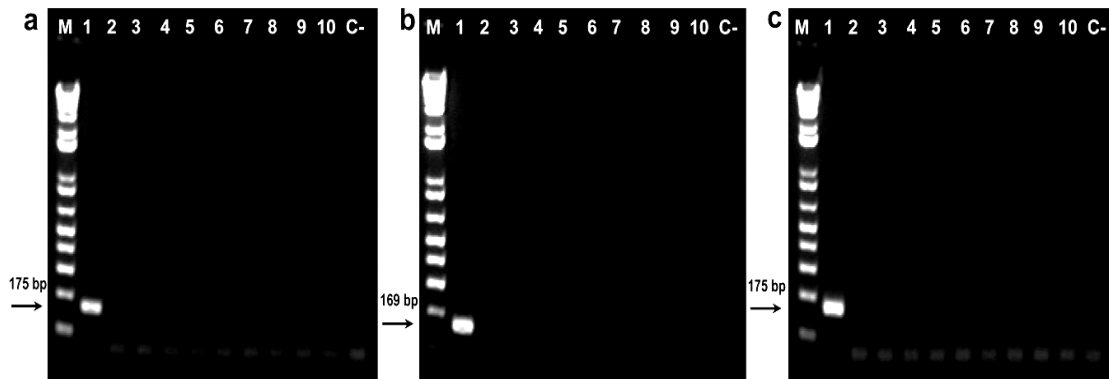


Fig. 3. Electrophoretic analysis of the 12S rRNA amplification products from cervid meats using species-specific primers. (a): Red deer (lane 1), fallow deer (lane 2), and roe deer (lane 3) amplified with primers 12S-CE and 12S-CERVINV. (b): Fallow deer (lane 1), red deer (lane 2), and roe deer (lane 3) amplified with primers 12S-DD and 12S-CERVINV. (c): Roe deer (lane 1), red deer (lane 2), and fallow deer (lane 3) amplified with primers 12S-CC and 12S-CERVINV. In all images, lanes 4–10 include: chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine, respectively. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

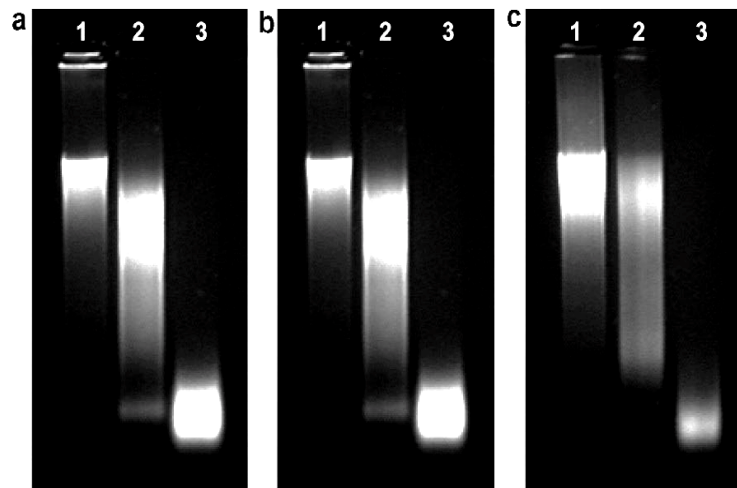


Fig. 4. Electrophoretic analysis of total genomic DNA extracted from: (a) red deer, (b) fallow deer, and (c) roe deer meats. Samples correspond to: raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. 2 µL of the total DNA extracted were loaded.

samples appears more intact and is of high molecular weight. However, PCR results indicate effective amplification of the desired DNA segments in all raw and heat-treated samples, confirming the ability of the PCR to amplify relatively short segments in highly damaged DNA (Fig. 5).

Satisfactory PCR results were also accomplished when several commercial processed deer meat products were analyzed with the deer-specific primers pairs. Fig. 6 shows the ability of the 12SCE-FW and 12SCERV-REV oligonucleotides to yield the 175 bp amplicon from red deer species in the dry-cured and cooked commercial products analyzed. Similarly, DNAs from fallow deer and roe deer species were also amplified successfully after the analysis of commercial meats with their respective specific primer pairs (not shown). These results indicate the capability of the PCR technique developed to selectively amplify the desired DNA segments from the cervid meats analyzed in this study.

The vast majority of PCR applications published to date for meat identification are focused on domestic species like

cattle, sheep, goat, pig, turkey or chicken (Colombo et al., 2002; Girish et al., 2004; Herman, 2001; Hird et al., 2003; Rodríguez et al., 2004). In contrast, considerably fewer studies have been reported so far about game meat authentication employing PCR-based approaches. Among them, the use of the mitochondrial genome as marker for the development of techniques such as PCR-RFLP is a widely extended choice (Brodmann et al., 2001; Fajardo et al., 2006; Matsunaga et al., 1998; Pfeiffer, Burger, & Brenig, 2004; Verkaar et al., 2002; Wolf et al., 1999). However, in the analysis of thermally processed foods harbouring highly fragmented DNA, PCR-RFLP may result unsuitable for species identification since relatively large amplicons are commonly required to carry out enzymatic restriction of DNAs (Fajardo et al., 2006). Besides, the applicability of PCR-RFLP methodology may be restricted in the analysis of admixed meats (sausages, pates, minced meat products, etc.) including two or more species in their composition, because results obtained after digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous

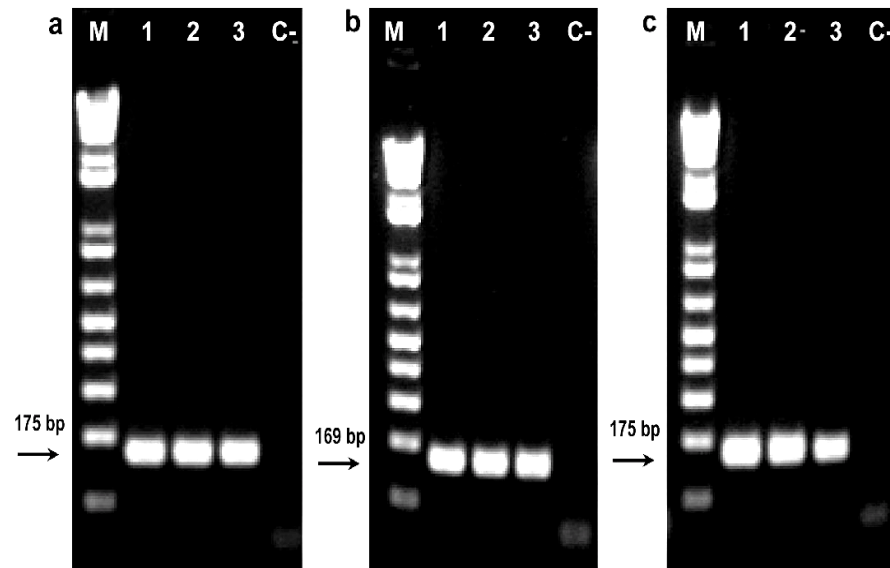


Fig. 5. Electrophoretic analysis of the 12S rRNA amplification products obtained from the meat DNAs shown in Fig. 4, with the use of: (a) red deer, (b) fallow deer, and (c) roe deer species-specific primers. Samples correspond to raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

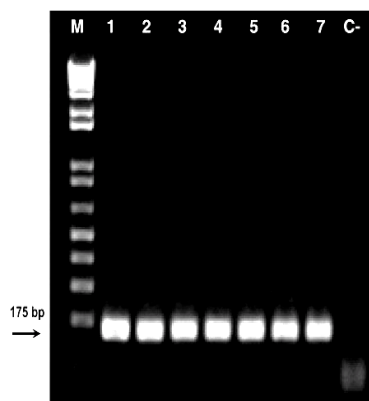


Fig. 6. Electrophoretic analysis of the 12S rRNA amplification products obtained from several commercial red deer products using 12SCE-FW/12SCERV-REV primers. A samples correspond to: positive control of raw meat (lane 1), dry-cured ham brand A (lane 2), dry-cured ham brand B (lane 3), dry-fermented cured sausage brand A (lane 4), dry-fermented cured sausage brand B (lane 5), cooked meat brand A (lane 6), and cooked meat brand B (lane 7). M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

restriction patterns representing all the possible species included in the adulterated sample (Girish et al., 2005). Considering these aspects, PCR using species-specific primers directed to short DNA fragments offers an excellent alternative for meat authentication, since this technique would allow species identification of the target species from a pool of different DNAs, without the need for further sequencing or digestion of the PCR products with restriction enzymes.

In conclusion, compared to other PCR-based techniques such as PCR-RFLP (Cronin, 1992; Pfeiffer et al., 2004; Verkaar et al., 2002), PCR-sequencing (Brodmann et al., 2001; Colombo et al., 2004), or random amplified polymor-

phic DNA (RAPD) (Koh et al., 1998), PCR using specific primers is costlier and may be more appropriate for species identification in game meat products submitted to different processing treatments (Arslan et al., 2006; DiPinto et al., 2005). The technique reported here could provide a useful tool in inspection programs to enforce labeling regulation of game and other meat products.

Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265* from the Dirección General de Universidades e Investigación. Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Inés López-Calleja and Irene Martín are recipients of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

References

- Arslan, A., Ilhak, O. I., & Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72, 326–330.
- Ashoor, S. H., Monte, W. C., & Stiles, P. G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 71, 397–403.

- Brodmann, P. D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E. C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology*, 212, 491–496.
- Chen, F. C., & Hsieh, Y. H. (2000). Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. *Journal of AOAC International*, 83, 79–85.
- Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M., & Saito, M. (1994). Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Science*, 37, 337–345.
- Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., & Ward, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, 34, 409–414.
- Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., & Cantoni, C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Meat Science*, 61, 291–294.
- Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantoni, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. *Meat Science*, 66, 753–755.
- Cronin, M. A. (1992). Analysis of total mitochondrial DNA (mtDNA) with restriction enzymes to identify mtDNA genotypes among North American cervids: moose, caribou, elk, white-tailed deer and mule deer. *Journal of Mammalogy*, 73, 70–82.
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Conversano, M. C., & Tantillo, G. M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16, 391–394.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., Von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., et al. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in different heat-treated bovine meat and bone meal. *Journal of Food Protection*, 66, 103–109.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J. L., & Demeulemester, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 863–867.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., et al. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107–112.
- Herman, B. L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 429–436.
- Hird, H., Goodier, R., & Hill, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. *Meat Science*, 65, 1117–1123.
- Koh, M. C., Lim, C. H., Chua, S. B., Chew, S. T., & Phang, S. T. W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, 48, 275–285.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, S., Muroya, S., Nakai, H., Shibata, K., et al. (1998). Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Science*, 49, 379–385.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, S., Muroya, S., Nakai, H., Shibata, K., et al. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143–148.
- Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. *Genetics*, 5, 30.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*, 67, 172–177.
- Toorop, R. M., Murch, S. J., & Ball, R. O. (1997). Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. *Food Research International*, 30, 629–636.
- Vallejo, B., González, A. F., Mazorra, M. A., & Rodríguez, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of Separation Science*, 28, 826–836.
- Verkaar, E. L. C., Nijman, I. J., Boutaga, K., & Lenstra, J. A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Science*, 60, 365–369.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.



PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region

V. Fajardo, I. González *, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, T. García,
P.E. Hernández, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 18 July 2006; received in revised form 15 November 2006; accepted 2 February 2007

Abstract

A polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for the identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by using oligonucleotides targeting mitochondrial D-loop sequences. A D-loop region (~700–1000 bp) was firstly amplified and sequenced from various game and domestic meat DNAs, and three primer sets were then designed on the basis of nucleotide multialignment of the generated D-loop sequences. As expected from sequence analysis, PCR amplification of the targeted D-loop fragments was successfully achieved from chamois (88 bp), pyrenean ibex (178 bp), and mouflon (155 bp) meats, showing adequate specificity and reproducibility against a number of game and domestic meats. Mouflon and sheep meats were amplified together in accordance to the high nucleotide identity of their mt D-loop sequences. In this work, satisfactory amplification was also accomplished in the analysis of experimentally pasteurized (72 °C for 30 min) and sterilized (121 °C for 20 min) meats, with a detection limit of ~0.1% for each of the targeted species. The proposed PCR assay represents a rapid and straightforward method for the detection of possible adulterations in game meat products.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Species identification; Caprinae; Chamois; Pyrenean ibex; Mouflon; Sheep; Goat; D-loop; Polymerase chain reaction (PCR)

1. Introduction

To enforce control measures on the authentication of meat, legislative authority establishes that meat products must be accurately labelled regarding species content (Pascal & Mahé, 2001). In this framework, game meat is a susceptible target for fraudulent labelling due to the economic profit that results from selling cheaper meat as meat from more profitable and desirable species. Moreover, illegal trade of certain wild game species may contribute, not only to meat adulteration but also to severe depletion of biodiversity (Brodmann, Nicholas, Schaltenbrand, & Ilg, 2001;

Colombo, Cardia, Renon, & Cantoni, 2004). For these reasons, development of accurate methods for determining the animal species in raw and processed meats are highly needed to protect both consumers and producers from frauds, and also to avoid over-exploitation and illegal market trafficking of game meat products (Lenstra, Buntjer, & Janssen, 2001; Teletchea, Maudet, & Hänni, 2005).

A number of classic analytical methods have been developed that allow the determination of the authenticity of meat through the study of its components, either by capillary electrophoresis (Vallejo, González, Mazon, & Rodríguez, 2005), gas chromatography (Toorop, Murch, & Ball, 1997), or immunological techniques (Giovannacci et al., 2004), among other approaches. Although most of these methods are of considerable value in certain instances, they are not convenient for routine sample analysis because they

* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.
E-mail address: gonzalzi@vet.ucm.es (I. González).

are relatively costly, time consuming, and complex to perform. Moreover, they have the limitation of relying on the analysis of proteins, many of which are heat labile (Chen & Hsieh, 2000). As an alternative to protein analysis, DNA-based methods applied to meat speciation offer several advantages: (i) DNA is a relatively stable molecule, allowing analysis of processed and heat-treated food products, (ii) the information content of DNA is greater than that of proteins due to the degeneracy of genetic code as one goes from DNA to protein, and (iii) DNA is present in all kinds of tissue due to its ubiquity in every type of cell (Meyer & Candrian, 1996).

Among DNA-based methods, PCR technology provides the food analyst with a simple, specific, and highly sensitive tool for the authentication of species in food products (Fei et al., 1996). In particular, the use of mitochondrial DNA (mtDNA) sequences for species identification by PCR may offer a series of advantages over other genetic markers, such as cell nucleus DNA. Whereas detection of nuclear DNA might be limited as a result of the generally low copy number of sequences, utilization of mtDNA increases PCR amplification sensitivity because there are several copies of mtDNA per cell. Besides, the large variability of mtDNA allows reliable identification and differentiation of precise species in food mixtures (Girish et al., 2004). Among mitochondrial genes, the cytochrome *b* (Matsunaga et al., 1999; Verkaar, Nijman, Boutaga, & Lenstra, 2002; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999), the 12S and 16S ribosomal RNA subunits (Bottero et al., 2003; Fajardo et al., 2006; Rodríguez et al., 2003, 2004), and the displacement loop region (D-loop) (Fei et al., 1996; Gao, Liang, Zhang, & Zhu, 2004; Montiel-Sosa et al., 2000) are the most widely used markers in the development of DNA methods for species identification.

Besides the selection of adequate genetic markers, a crucial feature of any PCR-based method is the design of the oligonucleotides. The use of specifically designed primers under restrictive conditions of PCR amplification have made possible the direct and specific identification of amplified mtDNA fragments, avoiding subsequent sequencing or restriction fragment length polymorphism (RFLP) identification (Kusama, Nomuta, & Kadowaki, 2004; Rodríguez et al., 2004).

The demand for game meat is growing because consumers are increasingly becoming concerned about healthy and safe products. Game meat is low in fat and cholesterol, it has high levels of polyunsaturated fatty acids, the animals are not injured with hormones or steroids, and the meat has a fine texture and delicate flavour when prepared properly (Hoffman & Wiklund, 2006). Among ruminant bovids, the subfamily *Caprinae* includes the closely related genera *Rupicapra*, *Capra* and *Ovis* (Groves & Shields, 1996). The three European game meat species comprising these genera are *Rupicapra rupicapra* (chamois), *Capra pyrenaica* (pyrenean ibex), and *Ovis ammon* (mouflon) (Wolf et al., 1999). Considering all the above-mentioned aspects, we describe in the present study a PCR method using specific primers

for the identification of meats from these three *caprinae* species. The assay is based on the selective amplification of mt D-loop sequences from chamois, pyrenean ibex, and mouflon.

2. Materials and methods

2.1. Selection and preparation of meat samples

Authentic muscle samples of chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*), were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz).

Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species was morphologically identified before the samples were obtained.

Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20°C until use. Chamois, pyrenean ibex, and mouflon meats were also analyzed after being subjected to experimental pasteurization (72°C for 30 min) and sterilization (121°C for 20 min) treatments.

Binary mixtures of chamois, pyrenean ibex or mouflon meat with swine meat were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, five different percentages containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% (wt/wt) of the target species were prepared with a blender (Sunbeam Oster, FL) to a final weight of 50 g. The 100% from chamois, pyrenean ibex, mouflon, and swine meats was also used as control in the analysis of the binary mixtures. Fifteen grams of each mixture was pasteurized at 72°C for 30 min, and another 15 g was sterilized at 121°C for 20 min.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described in a previous work (Fajardo et al., 2006).

The DNA extracted from raw and processed tissues was electrophoresed in a 1% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. Genomic DNA was visualized by UV transillumination using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.3. Amplification and sequencing of a conserved fragment in the mitochondrial D-loop region from different game and domestic meats

DLOOP-FW and DLOOP-REV conserved oligonucleotides (Table 1) were designed for the amplification of DNA fragments from chamois, pyrenean ibex, mouflon, red deer, fallow deer, roe deer, sheep, goat, cattle, and swine. These primers flanked a D-loop region of approximately 700–1000 bp, and were designed based on sequences available in the Genbank/EMBL database for various mammal species using EMBOSS software package version 2.2.0. and Primer Express 2.0 software (Perkin–Elmer/Applied Biosystems Division, Foster city, CA).

Double-stranded amplifications were carried out in a total volume of 25 μ L. Each reaction mixture contained 100–200 ng of template DNA, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris–HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ and 0.001% BSA.

PCR was accomplished in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK) programmed to perform a denaturation step of 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles consisting of 20 s at 94 °C, 20 s at 60 °C, and 45 s at 72 °C. The last extension step was 5 min longer. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% D1 (Hispanlab S.A.) agarose gels with ethidium bromide staining (1 μ g/mL), using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad).

Mitochondrial D-loop amplicons were subsequently purified and sequenced following the procedure described by Fajardo et al. (2006). DLOOP-FW and DLOOP-REV oligonucleotides were used in the sequencing reactions (Table 1).

2.4. Selective amplification of specific D-loop fragments from chamois, pyrenean ibex, and mouflon meats

Alignment of mt D-loop sequences obtained from the closely related *caprinae* species: chamois (AM 279274, AM 279275), pyrenean ibex (AM 279276, AM 279277, AM 279278), mouflon (AM 279279, AM 279280), sheep (AM 279282, AM 279283, AM 279284, AM 279285), and

goat (AM 279286, AM 282549) was performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. Based upon detailed analysis and comparison of the aligned mt D-loop sequences, three primer pairs were designed for the specific identification of chamois, pyrenean ibex, and mouflon/sheep meats. To assess the specificity of the primers, sequence analysis was also performed with the D-loop fragments obtained in other game and domestic species like red deer (AM 279271), fallow deer (AM 279272), roe deer (AM 279273), cattle (AM 279287), and swine (AM 279281).

The primer sets RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV and PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV were expected to yield specific DNA fragments of 178 bp and 88 bp in the D-loop region of chamois, and pyrenean ibex, respectively. Because of the high D-loop sequence homology between mouflon and sheep, the third set OADLOOP-FW/OADLOOP-REV was designed complementary to a common 155 bp DNA fragment of these two ovine species. Besides, another primer pair relying on conserved mt D-loop sequences from all analyzed species (ENDLOOP-FW/DLOOP-REV) was used as internal standard in each PCR reaction in order to exclude possible false negative amplifications. The sequence and description of the primers used in this work is summarized in Table 1.

DNA amplifications were carried out in a final volume of 25 μ L containing 100–200 ng of template DNA, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M of each dNTP, 7 pmol (mouflon/sheep primers) or 25 pmol (chamois and pyrenean ibex primers), and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris–HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, and 0.001% bovine serum albumin (BSA). Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94 °C for 20 s, primer annealing at 56 °C (for pyrenean ibex), 58 °C (for chamois) or 65 °C (for mouflon/sheep) for 20 s, and primer extension at 72 °C for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at 94 °C for 3 min was carried out to improve the final result. At each PCR conditions, internal control amplifications were set with ENDLOOP-FW and DLOOP-REV primers.

PCR products (10 μ L) amplified with chamois, mouflon/sheep, and endogenous control primers were electrophoresed in a 2% D1 (Hispanlab) agarose gel. PCR products

Table 1
DNA sequences of the primers used in this study

Primers	Length (bp)	Sequence (5' 3')	Description
DLOOP-FW	23	GGTCTTGTAACAGANAAGGAG	Conserved forward primer
DLOOP-REV	19	TGACGGCCATNGCTGAGTC	Conserved reverse primer/endogenous control reverse
ENDLOOP-FW	20	TACCATGCCGCGTGAAACCA	Endogenous control forward
RPDLOOP-FW	22	GCAATAATGTAATGCAAACGCG	Chamois forward primer
RPDLOOP-REV	26	CAAATGTAGCATGTACTATCAACCCCT	Chamois reverse primer
PIDLOOP-FW	26	CCTTCACACAGTTTATTATATGTCGG	Pyrenean ibex forward primer
PIDLOOP-REV	26	ACCATAAAATGTAGTGTACACATGCC	Pyrenean ibex reverse primer
OADLOOP-FW	30	GGGGGTAACTATTTTCATGAACCTTAACACG	Mouflon/sheep forward primer
OADLOOP-REV	29	CCAAATGCTTGACACCACAGTTATGATAG	Mouflon/sheep reverse primer

(10 µL) amplified with pyrenean ibex primers were electrophoresed in a 3.5% MS8 (Hispanlab) agarose gel. Each agarose gel contained 1 µg/mL ethidium bromide in Tris–acetate buffer (0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 90 V for 60 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad).

3. Results and discussion

DNA-based methods applied to species identification in animal products have received particular attention in recent years (Lenstra et al., 2001; Meyer & Candrian, 1996). Such methods include the development of conserved mitochondrial or nuclear DNA primers for PCR amplification, followed by complementary techniques like sequencing (Colombo et al., 2004), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Sáez, Sanz, & Toldrá, 2004), or restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Verkaar et al., 2002). Alternatively, PCR using specific primers is a widely applied approach for direct detection of target species by means of simplex or multiplex PCR formats (Herman, 2001; Matsunaga et al., 1999; Rodríguez et al., 2003).

In this work, specific primers were developed on the highly variable mitochondrial D-loop region to attempt PCR identification of meats from the *caprinae* species: chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*). The method discriminates specifically between the meats from these wild species and other game and domestic meats including their phylogenetically related counterparts sheep and goat. Additionally, identification of certain protected meat species is an important topic concerning wildlife law enforcement and a high degree of certainty is needed if the results are to be used in legal actions (Colombo et al., 2004).

The mitochondrial D-loop region was selected for PCR identification because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes, and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome. The D-loop is included in the control region of the mtDNA and it is flanked by the tRNA-pro and tRNA-phe mt genes (Sbisà, Tanzariello, Reyes, Pesole, & Saccone, 1997).

Firstly, comparison of mitochondrial D-loop sequences available in the GenBank/EMBL databank for various mammal species allowed the design of DLOOP-FW and DLOOP-REV conserved primer pair. These oligonucleotides were expected to amplify a common DNA fragment from various game and domestic meats such as chamois, pyrenean ibex, mouflon, red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, goat, and swine. Bands obtained after PCR amplification with the DLOOP conserved primers ranged in size (from 700 to 1000 bp) depending on the species (not shown), according to the finding that the control

region is primarily responsible for the observed variation in length of the vertebrate mitochondrial genome (Cozzi et al., 2004; Lai, Liu, Liu, Li, & Yao, 2006).

Accurate species identification by PCR is greatly dependent on the specificity of the primers used, which should hybridize to a DNA segment with sufficient species-to-species variation (Kusama et al., 2004). To fulfill the PCR identification requirements of our study, DLOOP amplicons obtained from various individuals of the closely related chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep and goat, were sequenced and aligned so that suitable *caprinae* sequences could be specifically targeted for primer design. Moreover, to ensure the specificity of the primers and exclude non-desired amplifications, sequence data from DLOOP amplicons obtained in other wild and domestic species such as red deer, fallow deer, roe deer, cattle, and swine, was also compiled and analyzed.

Fig. 1 shows alignment of chamois, pyrenean ibex, mouflon, sheep, and goat sequences amplified with the conserved DLOOP oligonucleotides. From the multialignment data it is inferred the existence of several point mutations as well as different D-loop sequence sizes within chamois and pyrenean ibex individuals. As can be seen in the figure, this variability originated two sequence types for chamois (AM 279274, AM 279275) and three for pyrenean ibex (AM 279276, AM 279277, AM 279278) showing different nucleotide lengths. The information recorded after detailed comparison of the D-loop sequences permitted the design of RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV and PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV primer pairs, complementary to specific D-loop sequences from chamois and pyrenean ibex meats, respectively. Besides, the existence of a few punctual mutations within mouflon individuals also generated more than one D-loop sequence type for this species. It should be however pointed out that due to the high nucleotide homology displayed between mouflon and sheep, the primers OADLOOP-FW and OADLOOP-REV had to be designed targeting a common D-loop fragment from both ovine species. In agreement with other authors (Wolf et al., 1999), the sequence identity found in this study between mouflon and sheep D-loop sequences is explained by their close phylogenetic proximity, supporting the hypothesis that the mouflon (*Ovis ammon*) may be one of the original ancestors of the modern domestic sheep (*Ovis aries*) (Hiendleder, Mainz, Plante, & Lewalski, 1998). The consensus sequence was used in the case of sheep and goat DLOOP alignment to simplify the primer design. It should be also noted that analysis of the D-loop sequences obtained in red deer, fallow deer, roe deer, cattle, and swine, indicated no possibility of template-primer hybridization (not shown), confirming an adequate specificity in the design of the three primer pairs developed.

Results of PCR amplifications indicated that the size and specificity of the amplicons obtained with each of the three *caprinae* primer sets was as expected from sequence analysis. As can be seen in Fig. 2, the chamois primer set (RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV) amplified successfully

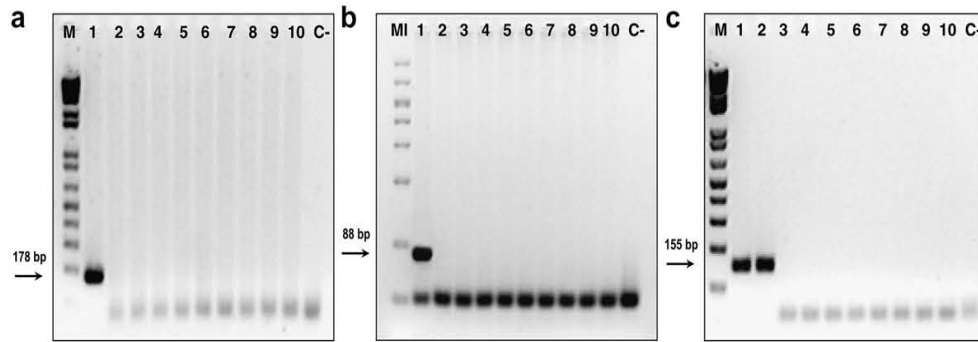


Fig. 2. Electrophoretic analysis of selective D-loop amplification from *caprinae* meats using specific primers. Samples are: (a) Chamois (lane 1), pyrenean ibex (lane 2), mouflon (lane 3), sheep (lane 4), and goat (lane 5) meats analyzed with chamois primers. (b) Pyrenean ibex (lane 1), chamois (lane 2), mouflon (lane 3), sheep (lane 4), and goat (lane 5) meats analyzed with pyrenean ibex primers. (c) Mouflon (lane 1), sheep (lane 2), chamois (lane 3), pyrenean ibex (lane 4), and goat (lane 5) meats analyzed with mouflon/sheep primers. In all electrophoretic images lanes 6–10 are samples of: red deer, fallow deer, roe deer, cattle, and swine, respectively. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). MI, Molecular weight marker 50–1000 pb ladder (Biomarker® Low, BioVentures, Inc.). C; negative control.

the 178 bp DNA fragment from chamois meat, whereas no amplification products were obtained with DNA from mouflon, pyrenean ibex, red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, goat, and swine meat samples (Fig. 2a). Similarly, DNA from pyrenean ibex was successfully amplified with the pyrenean ibex primer set PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV, generating a specific fragment of 88 bp unique to this species (Fig. 2b). Finally, and as expected from their sequence identity, the OADLOOP-FW/OADLOOP-REV primer pair amplified a fragment of 155 bp from mouflon and sheep meats, showing no amplification on DNA from the rest of the meat species

analyzed (Fig. 2c). Fifteen specimens from every selected meat species obtained from different origins were analyzed in the PCR assays, yielding consistent and reproducible DNA amplification bands. These results suggest an optimum specificity of the *caprinae* primer pairs when tested for PCR amplification against a number of game and domestic meat species significant for human consumption.

A common problem of PCR-based methods is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples. Inhibition influences the outcome of PCR reaction by lowering or completely preventing the amplification, thereby resulting in false negative results (Wilson, 1997). The European Standardization Committee in collaboration with the International Standard Organization, has proposed a general guideline for PCR testing that requires the presence of an internal control in each PCR reaction (Lund & Madsen, 2006). For this reason, an endogenous control amplification was performed in each PCR experiment using a set of primers (ENDLOOP-FW/DLOOP-REV) flanking a conserved ~270 bp fragment on the mitochondrial D-loop region of all game and domestic species analyzed in this study. As it is summarized in Fig. 3, successful and constant amplification of the targeted D-loop region was achieved with the endogenous primers, avoiding any possible false negative amplification throughout the assays due to PCR inhibition.

It is known that a critical factor in PCR analysis is represented by heat denaturation of DNA subsequent to the processing treatments applied in some meat products. DNA degradation has shown to cause failures in PCR protocols, mainly when the fragments to be amplified are too large (Arslan, Ilhak, & Calicioglu, 2006). In this context, PCR assays of food matrices in which thermal effects or other preservation treatments may degrade the food tissue DNA, should rely preferably on primers targeting short DNA fragments.

The effect of thermal treatment of meat on the technique's ability to identify species was studied through

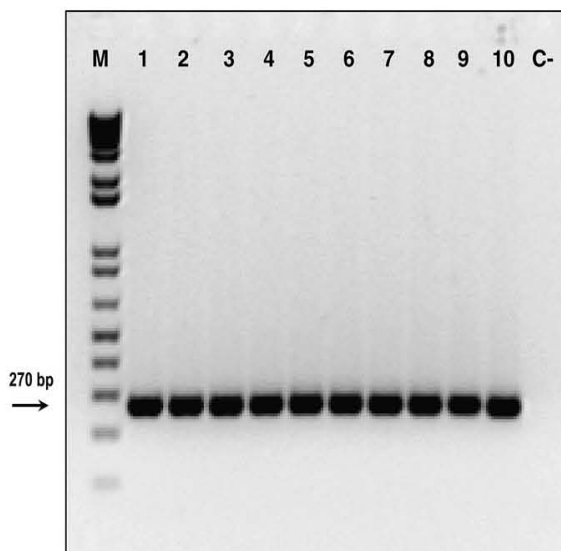


Fig. 3. Electrophoretic analysis of D-loop internal control amplification products obtained from (1) chamois, (2) pyrenean ibex, (3) mouflon, (4) sheep, (5) goat, (6) red deer, (7) fallow deer, (8) roe deer, (9) cattle, and (10) swine using ENDLOOP-FW and DLOOP-REV primers. M; molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C; negative control.

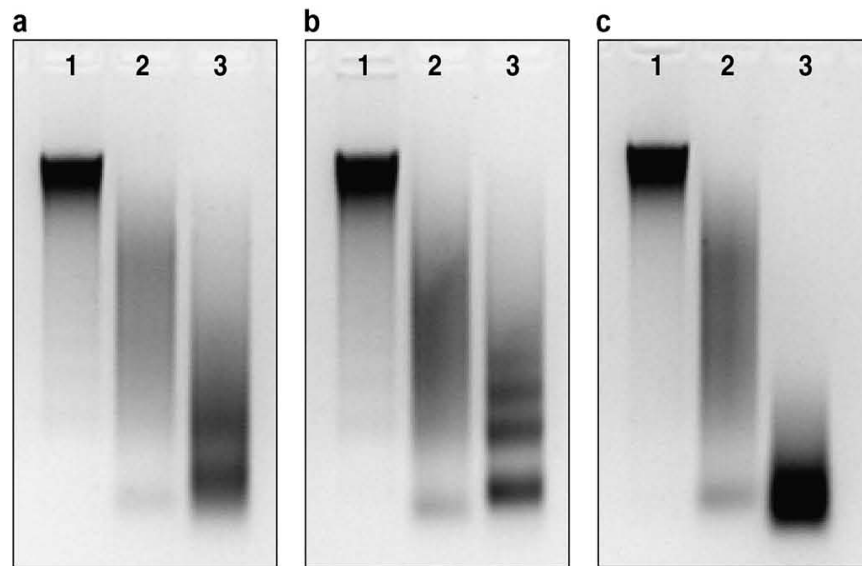


Fig. 4. Electrophoretic analysis of total genomic DNA extracted from: (a) chamois, (b) pyrenean ibex, and (c) mouflon meats. Samples correspond to: raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. 2 μ L of the total DNA extracted were loaded.

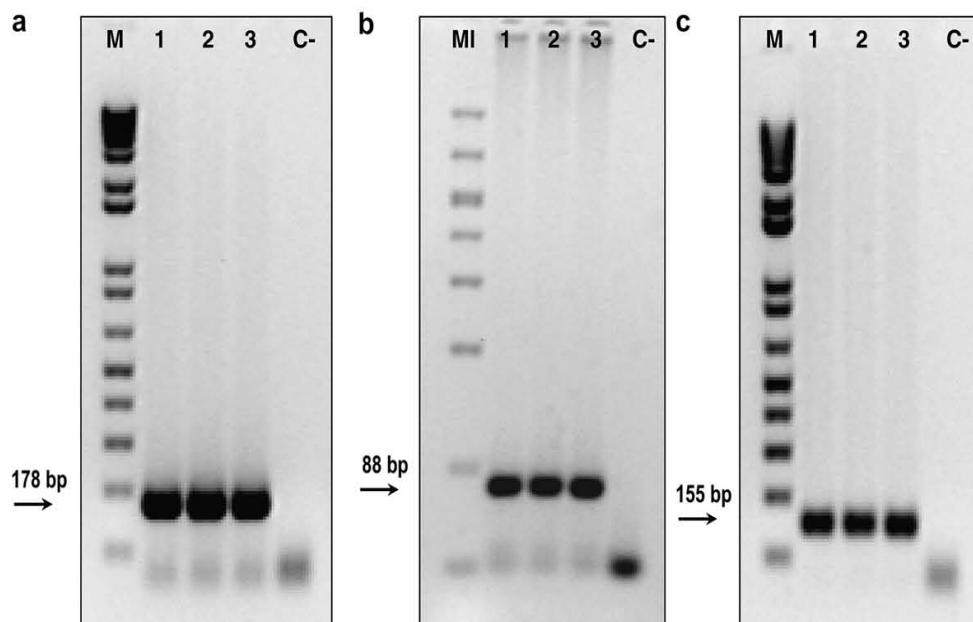


Fig. 5. Electrophoretic analysis of the D-loop amplification products obtained from the meat DNAs shown in Fig. 4, with the use of: (a) chamois, (b) pyrenean ibex, and (c) mouflon/sheep primers. Samples correspond to raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). MI, Molecular weight marker 50 1000 pb ladder (Biomarker® Low, BioVentures, Inc.). C; negative control.

PCR analysis of DNA extracted from experimentally pasteurized (72 °C for 30 min) and sterilized (121 °C for 20 min) *caprinae* meats. As can be appreciated in Fig. 4, DNA extracted from heat-treated meats exhibits a typical smear pattern of nucleic acid degradation, whereas DNA of raw meat samples appears intact and is of high molecular weight. However, PCR results indicate effective amplification of the desired DNA segments in all raw and heat-processed samples, confirming the ability of the PCR to amplify short sequences in highly damaged DNA (Fig. 5).

To determine the detection limit of the PCR assay, amplifications were performed on three series of binary muscle mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, 25% and 100% (wt/wt) of each target species in swine. For each PCR series, it was observed that the lower the percentage of target meat in the admixture, the fainter the band obtained in the PCR with the corresponding primers (Fig. 6). The detection limit (lowest meat percentage producing visible DNA amplification) of the assay was set on 0.1% for the three *caprinae* primers, either on raw

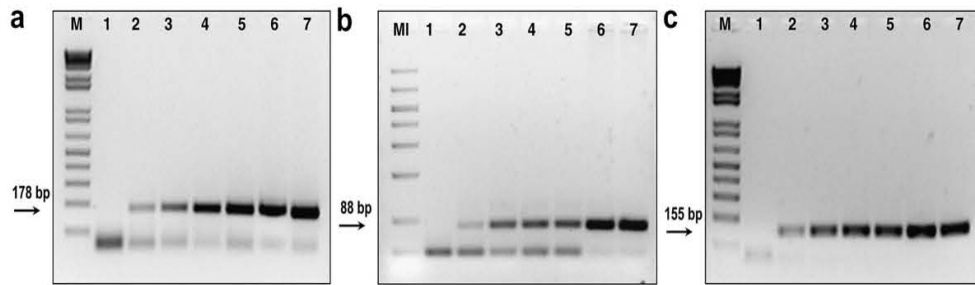


Fig. 6. Electrophoretic analysis of the D-loop PCR products obtained from binary mixtures of raw muscle from: (a) chamois in swine, (b) pyrenean ibex in swine, and (c) mouflon in swine, using RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV, PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV, and OADLOOP-FW/OADLOOP-REV primers, respectively. In all electrophoretic images lanes 1–6 are samples of binary mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, 25% and 100% of the target species, respectively. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). MI, Molecular weight marker 50 1000 pb ladder (Biomarker® Low, BioVentures, Inc.). C, negative control.

(Fig. 6), pasteurized or sterilized binary mixtures (results not shown).

The vast majority of PCR applications published to date for meat identification are focused on domestic species like for example cattle, sheep, goat, swine, turkey or chicken (Girish et al., 2004; Herman, 2001; Rodríguez et al., 2003, 2004). In contrast, considerable lesser works have been reported so far about game meat authentication employing PCR-based approaches. Among them, the use of mitochondrial genome as marker for the development of techniques such as PCR-RFLP is a widely extended choice (Verkaar et al., 2002; Wolf et al., 1999). However, in some cases, such as the analysis of thermally processed foods harbouring highly fragmented DNA, PCR-RFLP may result unsuitable for species identification since relatively large amplicons are commonly required to carry out enzymatic restriction of DNAs (Fajardo et al., 2006). Besides, the applicability of PCR-RFLP methodology may be restricted in the analysis of admixed meats (sausages, pates, minced meat products, etc.) including two or more species in their composition, because results obtained after digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous restriction patterns representing all the possible species included in the adulterated sample (Girish et al., 2005). Considering these aspects, PCR using specific primers targeting defined short DNA fragments offers an excellent alternative for meat authentication (Montiel-Sosa et al., 2000).

In conclusion, the results of the present work demonstrate that the PCR technique proposed using specific primers designed on the mitochondrial D-loop region represents a powerful alternative for detection and identification of fresh and processed chamois, pyrenean ibex, and mouflon/sheep meats, even at low levels of substitution. The method has the ability to selectively amplify D-loop sequences from a pool of phylogenetically close related *caprinae* sequences and other mammalian DNA templates. Compared with alternative molecular techniques such as direct sequencing of PCR products, PCR-RFLP, or RAPD, PCR with specific primers is cheaper, faster, and more suitable for routine analysis of large number of samples (Herman, 2001).

Acknowledgements

This study was supported by Grant no. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria S-505/AGR/000265* from the Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid. Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Inés López-Calleja and Irene Martín are recipients of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

References

- Arslan, A., Ilhak, O. I., & Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72, 326–330.
- Bottero, M. T., Dalmasso, I. A., Nucera, D., Turi, R. M., Rosati, S., Squadrone, S., et al. (2003). Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *Journal of Food Protection*, 66, 2307–2312.
- Brodmann, P. D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E. C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology*, 212, 491–496.
- Chen, F. C., & Hsieh, Y. H. (2000). Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. *Journal of AOAC International*, 83, 79–85.
- Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantoni, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. *Meat Science*, 66, 753–755.
- Cozzi, M. C., Strillacci, M. G., Valiati, P., Bighignoli, B., Cancedda, M., & Zanotti, M. (2004). Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. *Genetics Selection Evolution*, 36, 663–672.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus*

- capreolus), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Fei, S., Okayama, T., Yamanoue, M., Nishikawa, I., Mannen, H., & Tsuji, S. (1996). Species identification of meats and meat products by PCR. *Animal Science and Technology*, 67, 900–905.
- Gao, H. W., Liang, C. Z., Zhang, Y. B., & Zhu, L. H. (2004). Polymerase chain reaction method to detect *canis* materials by amplification of species-specific DNA fragment. *Journal of AOAC International*, 87, 1195–1199.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J. L., & Demeulemester, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 863–867.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., et al. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107–112.
- Groves, P., & Shields, E. F. (1996). Phylogenetics of the *Caprinae* based on cytochrome *b* sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 467–476.
- Herman, B. L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 429–436.
- Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y., & Lewalski, H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity*, 89, 113–120.
- Hoffman, L. C., & Wiklund, E. (2006). Game and venison-meat for the modern consumer. *Meat Science*, 74, 197–208.
- Kusama, T., Nomuta, T., & Kadowaki, K. (2004). Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal origin. *Journal of Food Protection*, 67, 1289–1292.
- Lai, S. J., Liu, Y. P., Liu, Y. X., Li, X. W., & Yao, Y. G. (2006). Genetic diversity and origin Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 146–154.
- Lenstra, J., Buntjer, J., & Janssen, W. (2001). On the origin of meat-DNA techniques for species identification in meat products. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 2, 1–15.
- Lund, M., & Madsen, M. (2006). Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 92–99.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Nakai, H., Shibata, K., et al. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143–148.
- Meyer, R., & Candrian, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel Wissen Und Technologie*, 29, 1–9.
- Montiel-Sosa, J. F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Rocalés, P., López-Pérez, M. J., & Pérez-Martos, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2829–2832.
- Pascal, G., & Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology*, 47, 1329–1342.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2003). Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie-gras by species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1524–1529.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*, 67, 172–177.
- Sáez, R., Sanz, Y., & Toldrá, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*, 66, 659–665.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205, 125–140.
- Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23, 359–366.
- Toorop, R. M., Murch, S. J., & Ball, R. O. (1997). Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. *Food Research International*, 30, 629–636.
- Vallejo, B., González, A. F., Mazorra, M. A., & Rodríguez, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of Separation Science*, 28, 826–836.
- Verkaar, E. L. C., Nijman, I. J., Boutaga, K., & Lenstra, J. A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Science*, 60, 365–369.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741–3751.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.

III.1. AUTHENTICATION OF GAME MEATS BY GENETIC TECHNIQUES

III.1.3. REAL-TIME PCR TECHNIQUES

- Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat Science** 2008, 79, 289-298.
- Real-time PCR for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Journal of AOAC International** 2008, 91, 103-111.
- A LightCycler TaqMan[®] assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Food Science and Technology International** (manuscript under revision).



Available online at www.sciencedirect.com



Meat Science 79 (2008) 289–298

MEAT
SCIENCE

www.elsevier.com/locate/meatsci

Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures

Violeta Fajardo, Isabel González *, Irene Martín, María Rojas, Pablo E. Hernández, Teresa García, Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 29 May 2007; received in revised form 26 September 2007; accepted 27 September 2007

Abstract

A rapid real-time polymerase chain reaction (PCR) technique using SYBR Green detection system, has been developed for the quantification of red deer, fallow deer, and roe deer DNAs in meat mixtures. The method combines the use of cervid-specific primers that amplify a 134, 169, and 120 bp of the 12S rRNA gene fragment of red deer, fallow deer and roe deer, respectively, and universal primers that amplify a 140 bp fragment on the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. The C_t (threshold cycle) values obtained with the 18S rRNA primers are used to normalize those obtained from each of the cervid-specific systems, serving as endogenous control for the total content of PCR-amplifiable DNA in the sample. Analysis of experimental raw and heat treated binary mixtures of red deer, fallow deer or roe deer meat in a swine meat matrix demonstrated the suitability of the assay for the detection and quantification of the target cervid DNAs in the range 0.1–0.8%, depending on the species and treatment of the meat samples analyzed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Species identification; 12S rRNA gene; Red deer; Fallow deer; Roe deer; Real-time PCR; SYBRGreen

1. Introduction

The need for reliable and sensitive methods for meat species identification encompasses many issues including the fraudulent substitution of cheaper meats in place of more expensive ones (Dooley, Paine, Garret, & Brown, 2004). Incorrect labeling of animal foods represents not only a commercial fraud but also a potential health problem in the case of consumers who exhibit sensitivity to undeclared allergens (Pascal & Mahé, 2001).

Game meat is an example of a susceptible target for fraudulent labeling due to the economic profit that results from selling cheaper meat as meat from more expensive and higher quality species (Brodmann, Nicholas, Schalten-

brand, & Ilg, 2001). Meat from game species is considered as a delicacy and commands a high price compared to other meats because it has a particular and intense flavour, it is lower in fat and cholesterol, it has high levels of polyunsaturated fatty acids and the animals are not injected with hormones or steroids. In this context, development of reliable and simple tools for the identification of meat from game species is necessary to protect consumers and ensure meat traceability along the food supply chain (Pfeiffer, Burger, & Brenig, 2004; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999).

To accomplish meat authentication, a range of analytical approaches have been tackled, broadly based on detecting either protein or DNA molecules (Teletchea, Maudet, & Hänni, 2005). DNA-based assays are particularly powerful in the analysis of food ingredients because DNA is less liable to be disrupted than are many proteins, identification is not dependent on the tissue, and sequence data can be

* Corresponding author. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.
E-mail address: gonzalzi@vet.ucm.es (I. González).

analyzed at different levels of specificity, from groups or species to even individuals (Fumière, Dubois, Baeten, Holst, & Berben, 2006).

During the last decade, a number of DNA-based techniques have been extensively developed with PCR being the most specific tool for the authentication of species in food products (Meyer & Candrian, 1996). In contrast to conventional PCR techniques, quantitative PCR approaches allow discrimination and measurement of even minute traces of different animal species in foods of complex composition. Particularly, real-time PCR refers to the process where the production of amplification products is directly monitored during each amplification cycle. The assay allows to quantification at an early stage in the PCR process, which is inherently more accurate than at the end point analysis typically associated with gel agarose or polyacrylamide electrophoresis (Feligini, Alim, Bonizzi, Enne, & Aleandri, 2007; Singer, Lawlor, & Yoe, 1999). Real-time data collection is achieved using fluorescent molecules that provide a strong correlation between fluorescence intensity and PCR product abundance (Wang, Zhu, & Levy, 2006).

There are various fluorescence based chemistries adapted to real-time PCR detection, which can be classified into two categories: probe-based such as TaqMan or FRET chemistries (Brodmann & Moor, 2003; Rensen, Smith, Jaravata, Osburn, & Cullor, 2006), and DNA intercalating dyes such as the SYBR Green molecule (Walker et al., 2004). While probe-based chemistries provide additional sequence-specificity to that given by the PCR primers, they are generally more difficult to design and optimize and add significantly to the overall costs of the analysis (Rodríguez, García, González, Hernández, & Martín, 2005). In contrast, a DNA binding dye like SYBR green, which adheres to the minor groove of the double-stranded DNA in a sequence-independent way, provides a flexible method without the need for individual probe design and optimization steps (Sawyer, Wood, Shanahan, Gout, & McDowell, 2003; Terzi et al., 2004).

In previous studies, we reported specific PCR-based assays for the qualitative identification of different game meat species (Fajardo et al., 2007a, 2007b). In this paper, we describe the development of a real-time PCR approach to quantify the amount of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) DNAs in raw and heat-treated meat mixtures using the SYBR green reagent as detection platform. The assay targets cervid-specific sequences on the 12S rRNA gene and makes use of an eukaryotic system based on a 18S rRNA fragment as endogenous control.

2. Materials and methods

2.1. Selection and preparation of meat samples

Authentic muscle samples of red deer (*C. elaphus*), fallow deer (*D. dama*), roe deer (*C. capreolus*), chamois

(*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural “El Pardo”), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Asturias, Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz). Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species was morphologically identified before the samples were obtained. Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20°C until use.

Three independent binary mixtures of red deer, fallow deer or roe deer meat in a swine meat matrix were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, five different mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% (wt/wt) of the corresponding target species in swine meat were prepared to a final weight of 100 g. Fifty milliliter of sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 8.09 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, and 2.6 mM KCl, pH 7.2) were added to the cervid/swine meat mixtures, they were then homogenized with a blender (Sunbeam Oster, Florida, USA).

The effect of thermal treatments on the technique's ability to identify the target species was checked through analysis of the binary mixtures after being subjected to sterilization treatment (121°C for 20 min). Raw and sterilized binary meat mixtures were processed directly or stored at -20°C until used.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from meat using a Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as described previously work (Fajardo et al., 2006). DNA concentration was estimated by UV absorption spectrophotometry at 260 nm.

2.3. Primer design

The primers used in the real-time PCR developed in this work were designed based on 12S rRNA and 18S rRNA gene sequences from various animal species available in the Genbank database, using the Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA).

Based on mitochondrial 12S rRNA sequences, three sets of primers were designed for the specific quantification of red deer (12SCEQFW-12SCEQREV), fallow deer (12SDDQFW-12SDDQREV), and roe deer (12SCCQFW-12SCCQREV) in the corresponding cervid/swine binary

meat mixtures. To accomplish the design, the following 12S rRNA sequences obtained previously (Fajardo et al., 2007a) were aligned and compared: red deer (AJ 885204, AJ 885205, AJ 885206), fallow deer (AJ 885203), roe deer (AJ 885202, AJ 972679, AJ 972680, AJ 972681, AJ 972682, AJ 972683), chamois (AM 158314), mouflon (AM 158317), pyrenean ibex (AM 158313), cattle (AJ 885201), sheep (AJ 885200), goat (AJ 885199), and swine (AM 158316). After detailed study of the alignment, 134, 169 and 120 bp 12S rRNA gene fragments were selected as the target sites for the specific detection of red deer, fallow deer and roe deer species, respectively. Another amplification system was used as endogenous control for the detection of eukaryotic DNA in order to normalize results obtained with each cervid-specific PCR system. The target site for the endogenous PCR system consisted of a 140 bp fragment of the 18S rRNA gene flanked by 18SEUDIR and 18SEUINV primers. The sequences and description of the primers used in this work are summarized in Table 1.

2.4. PCR conditions

The PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar oligonucleotide concentrations (50, 300, and 900 nM). Primer concentrations yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest C_t (data not shown) were 300 nM of specific red deer (12SCEQFW-12SCEQREV) and fallow deer (12SDDQFW-12SDDQREV) primer pairs, and 900 nM of specific roe deer primer set (12SCCQFW-12SCCQREV). The endogenous control (eukaryotic) system used 300 nM of each primer (18SEUDIR-18SEUINV). The PCR reactions, using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10 ng of DNA, were performed in a total reaction volume of 20 μ l in a Microamp® Fast Optical/96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems) covered with optical adhesive cover, and were run with the 7900 HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) at the Centro de Genómica y Proteómica (Facultad de Biológicas, UCM, Spain) with the following program: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C (for roe deer) or 61 °C (for fallow deer and roe deer). The same program was used to amplify either the cervid-specific systems or the endogenous control fragment. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

2.5. Construction of the standard curve

Raw and sterilized binary meat mixtures of red deer, fallow deer or roe deer with swine, each containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% (wt/wt) of the target species, were prepared and used as standard curve in the real-time PCR assay. DNA (10 ng) from each percentage were included in each amplification reaction.

Table 1
DNA sequences of the primers used in this study

Primers	Length (bp)	Sequence (5'-3')	Description	Amplicon size (bp)	Amplicon T_m (°C)
12SCEQFW	32	CAAAAACATATAACGAAAGTAACCTTCCGACC	Red deer specific forward primer	134	76.5–78
12SCEQREV	28	AGTACTCTGGCGAATAGTTTGTCTGCA	Red deer specific reverse primer		
12SDDQFW	24	TAAACAACGAAAGGTAACCTTATCG	Fallow deer specific forward primer	169	78–79.5
12SDDQREV	19	AAAGCACCGCCAAATCCTT	Fallow deer specific reverse primer		
12SCCQFW	23	GGTAAAGCGTGTAAAGCATAC	Roe deer specific forward primer	120	72–73
12SCCQREV	25	GCTATCGTGTTCAGCTATTTCAA	Roe deer specific reverse primer		
18SEUDIR	23	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG	Eukaryotes forward primer	140	84–83
18SEUINV	18	TAATTGCGGCGCTGCTG	Eukaryotes reverse primer		

2.6. Data analysis

Real-time PCR data were plotted as the ΔR_n fluorescence signal vs. the cycle number. The Applied Biosystems 7900 HT sequencer detection system software calculates the ΔR_n using the equation $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, where R_n^+ is the fluorescence signal of the product at any given time, and R_n^- is the fluorescence signal of the baseline emission during cycles 6–15. An arbitrary threshold was set at the midpoint of the log ΔR_n vs. the cycle number plot. The C_t value is defined as the cycle number at which the ΔR_n crosses this threshold.

The amount of red deer, fallow deer or roe deer DNAs in an unknown sample was measured by interpolation from a standard curve of C_t values generated from known starting DNA concentrations (10 ng of DNA extracted from 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% of the experimental cervid/swine meat mixtures). The C_t corresponding to the percentage of the target cervid DNA in an unknown sample (C_t CE for red deer, C_t DD for fallow deer or C_t CC for roe deer) was determined as the ratio of the corresponding cervid-specific to total DNA threshold cycles with the following equations:

$$C_t\text{CE} = C_t\text{EU} * C_t\text{CES} / C_t\text{EUS} \quad (\text{for red deer samples})$$

$$C_t\text{DD} = C_t\text{EU} * C_t\text{DDS} / C_t\text{EUS} \quad (\text{for fallow deer samples})$$

$$C_t\text{CC} = C_t\text{EU} * C_t\text{CCS} / C_t\text{EUS} \quad (\text{for roe deer samples})$$

where $C_t\text{EU}$ is the threshold cycle average value of the standard samples (binary mixtures) using 10 ng of DNA in the endogenous PCR system; $C_t\text{CES}$, $C_t\text{DDS}$ or $C_t\text{CCS}$ is the C_t value of the unknown sample analyzed with the red deer, fallow deer or roe deer specific PCR system, respectively; $C_t\text{EUS}$ is the C_t value of the unknown sample analyzed with the endogenous PCR system.

Besides, the correlation between the variables, threshold cycle (C_t) and concentration ([]) is semilogarithmic:

$$C_t = b \log[\] + a$$

where b is the slope and a is the intercept.

The specificity of the reaction was verified by melting temperature (T_m) analysis of the amplification products immediately after the last reaction cycle. The T_m , which is specific for each amplicon, was determined during an additional phase of slow heating, from 60 °C to 95 °C in 20 min. During this period, a rapid decrease in the fluorescence occurs due to the denaturation of the amplicons, such that single strands of DNA appear with the successive detachment of the SYBR Green. The T_m is the temperature at which 50% of the amplicons are associated.

Linearity of the model was verified by analysis of variance (ANOVA): the F value expresses statistically the regression; the coefficient of correlation, r , expresses statistically the correlation between test results obtained (C_t values) and cervid concentration in the mixtures, whereas the coefficient of determination, r^2 , expresses quantitatively that correlation.

The following parameters were determined to study the sensitivity of the real-time PCR method (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993): (a) *Cochran's* test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of red deer, fallow deer or roe deer in the mixtures are homogeneous for a 0.05 significance level; (b) calibration sensitivity, which corresponds to the slope (as it is a linear model); (c) analytical sensitivity, which is the relationship between the randomness of the test results and the modifications due to the differences in concentration in the mixture, and is calculated as a quotient between the calibration sensitivity and mean standard deviation for all concentrations; and (d) discriminatory capacity, which corresponds to the inverse of the analytical sensitivity multiplied by Student's t value with a probability of 0.05 and degrees of freedom corresponding to the number of samples. This parameter represents the least difference in concentration of red deer, fallow deer or roe deer DNA in the mixture that can be quantified by the analytical method with a significant level. Analytical sensitivity and discriminating capacity are calculated from an average variance of the response, S^2_{comb} .

$$S^2_{comb} = \left(\sum (\phi_i \times S_i^2) \right) / \left(\sum \phi_i \right)$$

where S_i^2 is the variance of the responses of a certain concentration of the mixture and i and ϕ_i are the degrees of freedom of these responses.

To test the accuracy of the real-time PCR method, amplification reactions were performed in duplicate using three separate DNA extractions of different percentages (1%, 10%, and 25%) from each target species on raw and heat treated mixtures. The method was considered accurate, when through a Student's t -test, the mean value of recovery was not different from 100%.

Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained on three different days versus those obtained on the same day, to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained from the meat mixtures.

To carry out the validation of the real-time PCR technique, three separate DNA extractions of each percentage of red deer, fallow deer or roe deer in the corresponding binary cervid/swine mixtures were assayed on different days, using two replicates of each sample.

3. Results and discussion

3.1. Real-time PCR system set-up

In this work, the 12S rRNA mitochondrial gene has been selected as marker for cervid meat quantification.

To develop a robust method for quantitative detection of red deer, fallow deer, and roe deer meats in meat mixtures, three specific primer pairs and an eukaryotic primer set (endogenous control) were combined in a real-time

PCR method. The use of a conserved region in the ribosomal 18S sequence as an endogenous control is important because some factors affecting variation of target DNA amplification such as PCR inhibition, degradation, and quality of the DNA recovered from a sample can be taken into account. By comparison of species-specific versus endogenous control signal obtained from the samples, the inaccuracies caused by the use of standards and unknowns can be reduced. Besides, normalization of the amplification response between unknowns and reference standards is necessary to assure the reproducibility of the assay on different days. The endogenous control primer pair (18SEU-DIR-18SEUINV) was designed to amplify a DNA fragment of 140 bp from all the eukaryotic organisms tested with approximately the same efficiency.

Cervid-specific primers for red deer (12SCEQFW-12SCEQREV), fallow deer (12SDDQFW-12SDDQREV), and roe deer (12SCCQFW-12SCCQREV) amplified fragments of 134, 169, and 120 bp in the 12S rRNA gene, respectively. The amplicon size is reported to markedly affect amplification rates of real-time PCR assays. Consequently, species identification in samples where DNA is liable to be degraded must rely on amplification of short DNA targets (Hird et al., 2006).

3.2. Specificity

Each cervid-specific PCR system was tested for their selectivity and cross-reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. All species were analyzed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

The red deer-specific system (12SCEQFW-12SCEQREV) amplified a 134 bp fragment from red deer (C_t value of 19.26 ± 0.06) with a melting temperature (T_m) between 76.5 and 78 °C, whereas no amplification was achieved with DNA from fallow deer, roe deer, chamois, mouflon,

pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine meat samples (Table 2). Determination of a red deer-specific PCR positive result was based on the presence of the mentioned amplification product, which corresponds to sequence-specific hybridization between the red deer-specific primers and the homologous red deer DNA sequence. Under our experimental conditions, C_t values above those corresponding to the mean C_t value of all the non-target species and negative controls, minus twice their standard deviation ($C_t > 33.37$), were considered negative for the presence of red deer DNA. Similarly, the 12SDDFW/12SCERVREV primer pair amplified a fragment of 169 bp in samples from fallow deer meat (C_t value of 15.4 ± 0.04) with a melting temperature (T_m) between 78 and 79.5 °C, showing no amplification of DNAs from the rest of the meat species analyzed. In this case, C_t values higher than 34.92 were considered negative for the presence of fallow deer DNA. Finally, DNA from roe deer was successfully amplified (C_t value of 15.13 ± 0.05) with the roe deer primer set 12SCCFW/12SCERVREV, generating a specific fragment of 120 bp unique to this species. The determination of a roe deer-specific PCR positive result was based on the presence of an amplification product with a melting temperature between 72 and 73 °C that corresponds to sequence-specific hybridization between the roe deer-specific primers and the homologous roe deer DNA sequence. $C_t > 35.43$ was considered negative for the presence of roe deer DNA.

The eukaryotic (endogenous) system amplified a 140 bp fragment from all the eukaryotic species analyzed. With this system, all tested species showed C_t -values between 15.41 and 16.27 (Table 2), and a T_m between 83 and 84 °C.

3.3. Efficiency and quantification limit

Real-time PCR data obtained from different primer pairs are comparable only when the experimental efficiencies for the different reactions are similar and near to the

Table 2
Specificity of quantitative real-time PCR systems. Cycle number (C_t) values obtained from 10 ng of DNA

Common name	Scientific name	Red deer-specific PCR system (C_t)	Fallow deer-specific PCR system (C_t)	Roe deer-specific PCR system (C_t)	Eukaryotic PCR system (C_t)
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	19.26 ± 0.06	40	40	15.69 ± 0.06
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	35.99 ± 0.37	15.4 ± 0.04	40	16.09 ± 0.05
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	35.54 ± 0.94	40	15.13 ± 0.05	15.95 ± 0.12
Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>	38.34 ± 1.92	35.15 ± 2.5	34.76 ± 2	15.41 ± 0.1
Mouflon	<i>Ovis ammon</i>	35.56 ± 0.44	40	40	15.57 ± 0.03
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	35.56 ± 1.65	40	37.8 ± 2	15.58 ± 0.07
Cattle	<i>Bos taurus</i>	40	38.54 ± 1.69	40	16.03 ± 0.09
Sheep	<i>Ovis aries</i>	35.55 ± 0.99	40	40	15.58 ± 0.07
Goat	<i>Capra hircus</i>	40	40	40	16.27 ± 0.09
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	37.50 ± 2.12	36.09 ± 0.49	40	15.90 ± 0.17
		33.37 (*)	34.92 (*)	35.43 (*)	

$C_t >$ to the indicate values (*) are considered negative.

value of 100%. The efficiency (E) of a real-time PCR assay can easily be calculated from the formula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ (User Bulletin #2, ABI Prism 7700 SDS, Applied Biosystems).

The efficiency and quantification limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the standard curve made with the experimental binary mixtures containing five different percentages (0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25%) of either red deer, fallow deer or roe deer meat in a swine meat matrix. 10 ng of DNA from each binary mixture percentage was analyzed with the corresponding cervid-spe-

cific system and with the endogenous control primer set. Normalization was carried out on fluorescence results obtained for each mixture (0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25%) with the three cervid-specific systems and with the endogenous control, and these data were used as the calibration curve for further statistical studies. Results of the efficiency of the PCR approach for raw experimental binary mixtures are shown in Fig. 1. The slope of log input amount vs. ΔC_t has a value of -3.34 for the red deer-specific system (1a), -3.42 for fallow deer-specific system (1b), and -3.25 for roe deer-specific system (1c), near to the slope's value of

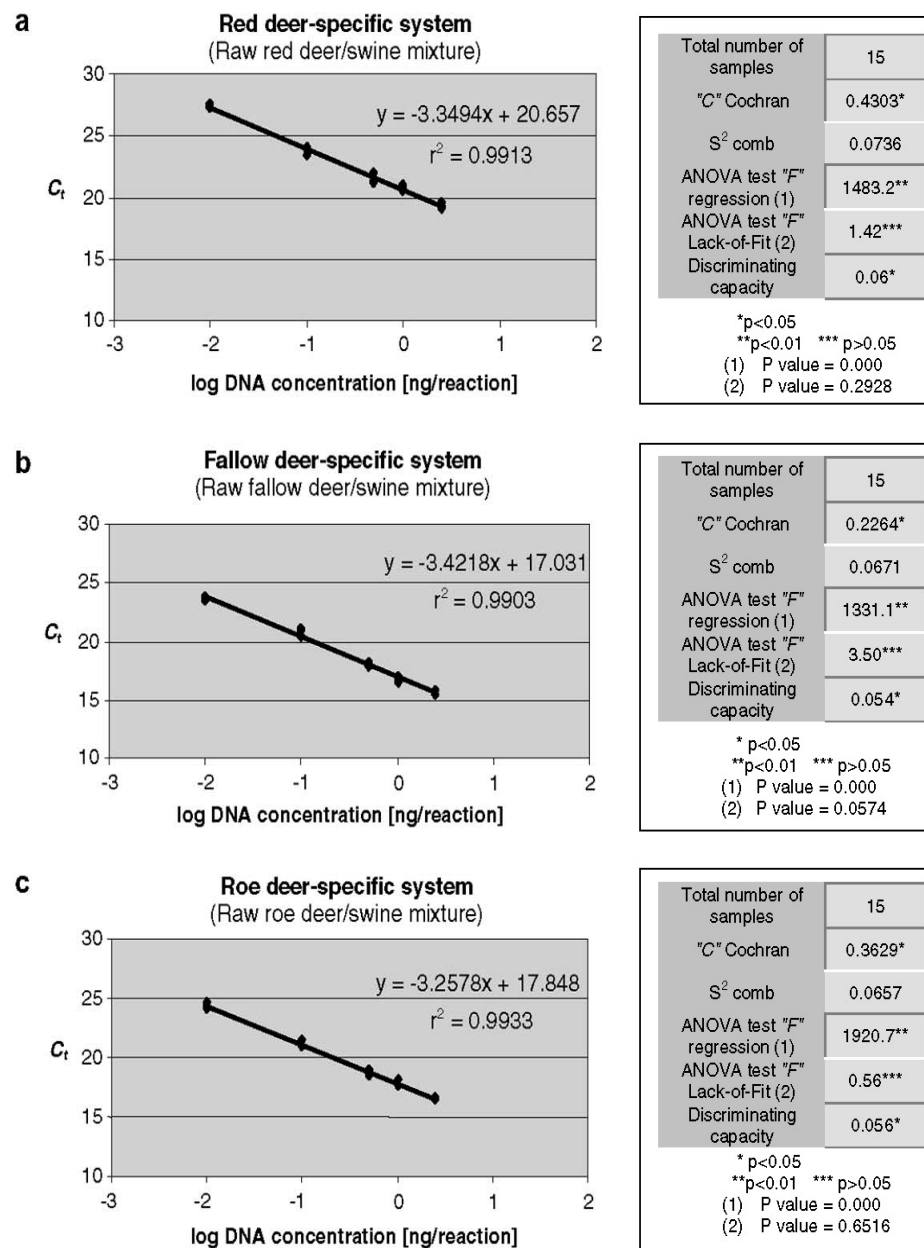


Fig. 1. Linearity test, regression line and sensitivity parameters of the red deer (a), fallow deer (b), and roe deer (c) specific PCR systems. Three different DNA extractions performed on five different mixtures (25%, 10%, 5%, 1% and 0.1%) of the corresponding target species in raw cervid/swine meat mixtures were used as standards.

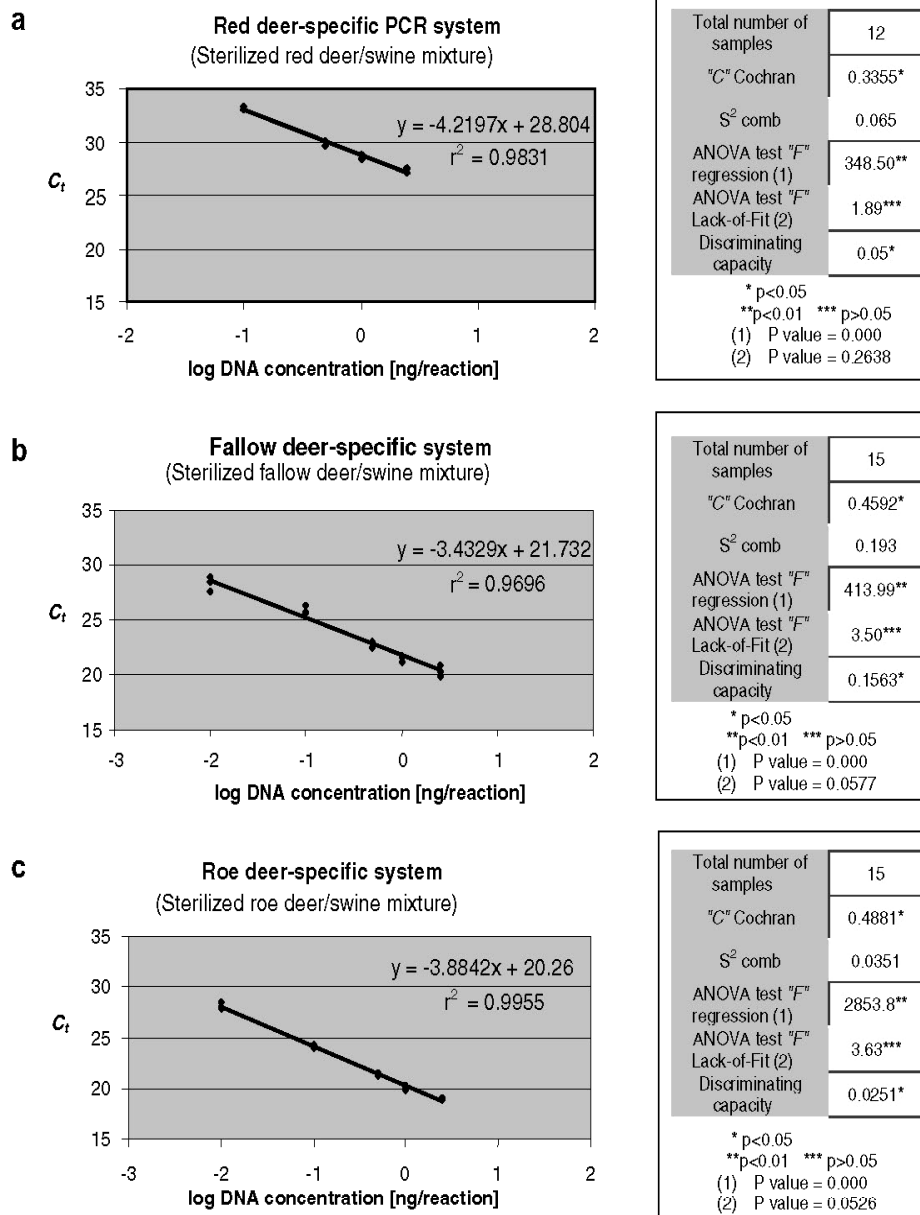


Fig. 2. Linearity test, regression line and sensitivity parameters of the red deer (a), fallow deer (b), and roe deer (c) specific PCR systems. Three different DNA extractions performed on five different mixtures (25, 10, 5, 1 and 0.1 (not in a) of the corresponding target species in sterilized cervid/swine meat mixtures were used as standard.

–3.32 corresponding to a 100% PCR efficiency. Similarly, Fig. 2 shows results obtained after analyzing the sterilized experimental mixtures.

The quantification limit for each cervid-specific PCR system was also calculated from the standard curves obtained with the experimental binary mixtures shown in Figs. 1 and 2. The quantification limit for the red deer specific system was estimated from the red deer standard curve as the DNA amount yielding a C_t value of 33.37 (the mean value less twice the standard deviation (SD) of the non-target species and negative controls). This value was 0.0001 ng, which corresponds to 0.001% red deer DNA in a raw mixture if 10 ng of total DNA are used in the assay

(Fig. 1a). Using the same approach, the quantification limits for fallow deer (C_t value of 34.92) and roe deer (C_t value of 35.43) specific systems when analyzing 10 ng of DNA from raw meats mixtures corresponded to $5.93 \times 10^{-5}\%$ fallow deer DNA (Fig. 1b) and $3.99 \times 10^{-5}\%$ roe deer DNA (Fig. 1c). Similarly, in sterilized binary mixtures, the quantification limits for DNA from red deer, fallow deer, and roe deer specific PCR systems were 0.8% (Fig. 2a), $1.4 \times 10^{-3}\%$ (Fig. 2b), and $3.32 \times 10^{-4}\%$ (Fig. 2c). It should be noted that although sterilization (121 °C for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing 0.8, 1.4×10^{-3} and $3.32 \times 10^{-4}\%$ of

red deer, fallow deer, and roe deer DNA, respectively. In this context, primers targeting short DNA fragments are desirable in PCR assays in which thermal effects or other preservation treatments may degrade the DNA present in food matrices (Arslan, Ilhak, & Calicioglu, 2006).

According to the results obtained, the real-time PCR method developed allows quantification of minute amounts of red deer, fallow deer or roe deer DNA as long as the reference sample used has received the same treatment as the samples analyzed. So, because of the variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in the real-time PCR assay developed, different calibration curves should be used in accordance with the target species, the tissue matrix and the heat treatment applied to achieve reliable quantification of the cervid meat content in a sample.

3.4. Sensitivity and linearity

Normalized C_t values obtained from the raw and heat treated meat mixtures of red deer, fallow deer, and roe deer in swine, versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figs. 1 and 2 show the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the red deer, fallow deer, and roe deer real-time PCR response was also analyzed for each experimental raw and heat treated binary mixture. In each case, the following parameters were evaluated: (a) *Cochran's* test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of red deer, fallow deer or roe deer DNA in the mixtures (raw and heat treated) were homogeneous, (b) regression analysis, and (c) variance analysis with Lack of-Fit. The results are also summarized in Figs. 1 and 2.

3.5. Accuracy and precision

The accuracy of the assay was determined from three meat percentages (25%, 10%, and 1%) of each raw and heat-treated binary mixture. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor *F*-test, it can be verified that the concentration of DNA present in a sample does not affect the variation of the results. The mean percentage recoveries obtained for red deer, fallow deer, and roe deer raw binary mixtures were 102.24%, 97.63% and 95.66%, respectively. The Student's *t*-test demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of the day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized binary mixtures, analyzed in duplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed significant differences with higher

CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. Thus, for the quantification of red deer, fallow deer, and roe deer DNAs, a standard curve should be determined on each day of analysis.

In spite of the extensive use of real-time PCR technology for gene expression analysis and identification of microorganisms, there are relatively few published reports on its application for food species quantification (Singer et al., 1999; Walker et al., 2004). Recent studies have focused on the development of real-time PCR assays for the differentiation and quantitative detection of meat species such as beef, pork, lamb, chicken, and turkey (Dooley et al., 2004; Lahiff et al., 2001; Laube, Zagon, & Broll, 2007; López-Andreo, Lugo, Garrido-Pertierra, Prieto, & Puyet, 2005; Rodríguez et al., 2004). However, qualitative and quantitative PCR-based detection approaches for less commonly consumed meat such as those from game species is scarce (Brodmann et al., 2001; Colombo, Cardia, Renon, & Cantoni, 2004; Pfeiffer et al., 2004; Wolf et al., 1999). To our knowledge, no reports are available on real-time PCR detection of commercially important cervid meat species like red deer, fallow deer, and roe deer.

The main potential advantages of real-time PCR technology are the possibility of performing quantitative measurements. Nevertheless, other benefits are: (1) It discriminates of the DNA origin without the need for any additional time consuming and laborious steps such as sequencing (Colombo et al., 2004), enzyme digestion (Fajardo et al., 2006), or conformational analysis (Rea, Chikuni, & Avellini, 1996); (2) Real-time PCR assays are rapid, since several 96-well plates can be assayed in a working day allowing routine high-throughput screening of multiple samples; (3) Fluorescence data can be collected directly from a real-time PCR instrument or a fluorescence spectrophotometer, avoiding the need for electrophoresis; (4) Potential contamination of the PCR mixture with target DNA is greatly reduced because the reaction tubes remain closed throughout the assay; (5) Providing equivalent efficiency and specificity, SYBR Green assays have lower cost compared to fluorescent probe-based assays performed using Taqman probes or molecular beacons (Brodmann & Moor, 2003; Frezza et al., 2003; López-Calleja et al., 2007).

The drawbacks of most real-time PCR applications come from the fact that the accuracy of the method can be influenced by factors affecting to the DNA yield such as the extent of DNA degradation and the presence of different tissues containing different numbers of mitochondria, and the high cost derived of specific fluorescent probes (López-Andreo, Garrido-Pertierra, & Puyet, 2006). To reduce this limitation, the use of species-specific primers and SYBR Green, a dye that binds in the minor groove of dsDNA, was introduced for the detection of PCR products without the need for probes linked to fluorescent molecules (Sawyer et al., 2003). Although multiplexing reactions cannot be performed with SYBR Green, specificity can be achieved by careful primer design

and reaction optimization, which can be confirmed from dissociation (or melt) curve analysis (Walker et al., 2004; Wang et al., 2006).

In conclusion, real-time quantitative polymerase chain reaction is a powerful technology that is accurate, simple, and relatively fast, with good sensitivity and specificity. The potential of the described procedure to detect and quantify small amounts of red deer, fallow deer and roe deer DNA in raw and heat treated meats may make it a useful tool for inspection programs to enforce labeling regulations of game and other meat products.

Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265* from the Comunidad de Madrid (Spain). Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Irene Martín is recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We appreciate the help provided by Esther Gil Alegre from the Facultad de Farmacia (UCM) with the validation of the analytical methods. We are indebted to Dr. Santiago Lavín González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), D. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), D. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), and D^a. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”) for kindly supplying game meat samples.

References

- Arslan, A., Ilhak, O. I., & Calicioglu, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*, 72, 326–330.
- Brodmann, P. D., & Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction system for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Science*, 65, 599–607.
- Brodmann, P. D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E. C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology*, 212, 491–496.
- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197–202.
- Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantoni, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. *Meat Science*, 66, 753–755.
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garret, S. D., & Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., et al. (2007b). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial d-loop. *Meat Science*, 76, 644–652.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., et al. (2007a). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 76, 234–240.
- Feligini, M., Alim, N., Bonizzi, I., Enne, G., & Aleandri, R. (2007). Detection of cow milk in water buffalo cheese by SYBR Green real-time PCR: sensitivity test on governing liquid samples. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 94–98.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., Von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., et al. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *Journal of Food Protection*, 66, 103–109.
- Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., Holst, C. V., & Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1045–1054.
- Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., Schneede, K., et al. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 23, 645–650.
- Lahiff, S., Glennon, M., Ó'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M., et al. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes*, 15, 27–35.
- Laube, I., Zagon, J., & Broll, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 336–341.
- López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7973–7978.
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18, 1466–1473.
- Meyer, R., & Candrian, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 29, 1–9.
- Pascal, G., & Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology*, 47, 1329–1342.
- Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. *Genetics*, 5, 30.
- Rea, S., Chikuni, K., & Avellini, P. (1996). Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig and wild boar meat samples. *Journal of Food Science*, 3, 211–220.
- Rensen, G. B., Smith, W. L., Jaravata, C. V., Osburn, B., & Cullor, J. S. (2006). Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay for the detection of prohibited meat and bone meal in cattle feed and feed ingredients. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 337–346.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2004). Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1478–1483.

- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Hernández, P. E., & Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantification of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.
- Singer, V. L., Lawlor, T. E., & Yoe, S. (1999). Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay. *Mutation Research*, 439, 37–39.
- Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: Update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23, 359–366.
- Terzi, V., Infascelli, F., Tudisco, R., Russo, G., Stanca, A. M., & Faccioli, P. (2004). Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technology*, 37, 239–246.
- Walker, J. A., Hughes, D. A., Anders, B. A., Shewale, J., Sinha, S. K., & Batzer, M. A. (2004). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Analytical Biochemistry*, 316, 259–269.
- Wang, Y., Zhu, W., & Levy, D. E. (2006). Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods*, 39, 356–362.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.

FOOD COMPOSITION AND ADDITIVES

Real-Time PCR for Quantitative Detection of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) and Pyrenean Ibex (*Capra pyrenaica*) in Meat Mixtures

VIOLETA FAJARDO, ISABEL GONZÁLEZ,¹ IRENE MARTÍN, MARÍA ROJAS, PABLO E. HERNÁNDEZ, TERESA GARCÍA, and ROSARIO MARTÍN

Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, 28040 Madrid, Spain

A real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) technique was developed for the quantification of chamois and pyrenean ibex DNAs in meat mixtures by using a SYBR[®] green detection platform. Two species-specific systems and a eukaryotic endogenous system were combined in the real-time PCR approach to quantify the target species. In the specific systems, a 133 base pair (bp) fragment of the 12S rRNA gene was amplified from chamois DNA, and an 88 bp fragment from the D-loop region was amplified from pyrenean ibex DNA. In the endogenous system, universal primers amplified a 141 bp fragment on the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. The threshold cycle values obtained with the 18S rRNA primers were used to normalize those obtained from chamois- or pyrenean ibex-specific systems, serving as endogenous control for the total content of PCR-amplifiable DNA in the sample. Analysis of experimental raw and heat-treated binary mixtures of chamois and pyrenean ibex meat in a swine meat matrix demonstrated the suitability of the assay for the detection and quantification of the target DNAs in the range of 0.1–0.8%, depending on the species and treatment of the meat samples.

Determining the species origin of meat is an integral part of food regulatory control with respect to economic fraudulence. Game meat products are often a target for false labeling because of the divergent prices between the different game and domestic meats sold in the market (1, 2). Moreover, banned trade of certain wild game species may contribute not only to meat adulteration but also to severe depletion of biodiversity (3). These facts call for the availability of reliable and rapid methods able to differentiate and identify meats from game animal species. Such methods must be

developed to protect both consumers and producers from fraud, and to prevent over-exploitation and illegal trafficking of game meat products through the food market (4).

Most of the methods reported for identification of meat species detect specific proteins by immunochemical assays (5), electrophoresis (6), isoelectric focusing (7), and chromatography (8). However, most proteins suffer denaturation in heated products, resulting in changed antigenicity and electrophoretic mobility of molecules (5).

As an alternative to protein analysis, molecular methods based on the study of nucleic acids have been developed and used for meat species authentication. DNA is a heat-stable and long-lived molecule; it is present in all kinds of tissue, and the information content of DNA is greater than that of proteins due to the degeneracy of genetic code (4, 9). In particular, the introduction of polymerase chain reaction (PCR) in food analysis has provided a vast range of techniques for rapid detection and identification of organisms at the species and intraspecies level. PCR-mediated techniques include the use of conserved mitochondrial or nuclear DNA primers for PCR amplification, followed by other approaches such as sequencing (3), restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP; 2), randomly amplified polymorphic DNA (PCR-RADP; 10), or single-stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP; 11). On the other hand, the PCR technique using species-specific primers can selectively detect DNA sequences from a food matrix and is less expensive and more useful for routine analysis of large numbers of samples than other PCR methodologies (12). A number of reports describe the use of specific PCR amplification of different mitochondrial or nuclear genes for identification of a wide range of commercial meats (10, 13–18). Mitochondrial genes evolve much faster than nuclear genes and thus contain more sequence diversity, facilitating the identification of phylogenetically related species (19).

The limitations of standard PCR assays include the insensitivity and lack of quantitation of end point analysis, and the dependence on a low throughput technique such as agarose gel electrophoresis for analysis of the products. Conversely, by means of quantitative PCR approaches, even minute traces of different animal species can be discriminated and measured in foods of complex composition (20–22).

Received July 30, 2007. Accepted by SG October 9, 2007.

¹Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: gonzalzi@vet.ucm.es

Table 1. Primers used in this study

Primers	Length, bp	Sequence (5' to 3')	Fragment amplified, bp	Description
12SRPQFW	25	GGCGTAAACGTGTTAAAGCAGCTC	133	Chamois-specific forward primer
12SRPQREV	30	TTTGGGTCTTCGCTATAGTGTGTCAGTTAC		Chamois-specific reverse primer
PIDLOOPQFW	26	CCTTCACACAGTTTATTATATGTCGG	88	Pyrenean ibex-specific forward primer
PIDLOOPQREV	26	ACCATAAAATGTAGTGACACATGCC		Pyrenean ibex-specific reverse primer
18SpEUDIR	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	141	Eukaryotic forward primer
18SpEUIINV	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC		Eukaryotic reverse primer

Quantitative real-time PCR formats provide sensitive and safe solutions by monitoring DNA and mRNA during each amplification cycle, and thus are inherently more accurate than conventional PCR tests (23).

There are various fluorescence-based approaches for real-time PCR detection, which can be classified into 4 types: hydrolysis probes such as TaqMan chemistry, hairpin probes like molecular beacons, fluorescent-labeled hybridization probes, and DNA intercalating dyes (23, 24). Probe-based chemistries allow specific detection and quantification by use of fluorescently labeled sequence-specific hybridization probes. However, their application requires the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid conditions which cannot always be easily met (16). In contrast, the simplest, least expensive, and most direct fluorescent system adapted to real-time PCR detection involves the incorporation of the dye SYBR[®] green whose fluorescence under UV greatly increases when bound to the minor groove of the double helical DNA (21, 25). Although this system is deficient in the specificity of the fluorescent DNA probes, SYBR green has the advantage of allowing a DNA melting curve to be generated, as well as software calculation of the melting temperature (T_m) of the specific amplicon after the PCR, so that false-positive signals due to nonspecific amplification or primer-dimers can be discarded (26).

The demand for game meat is growing because consumers are becoming increasingly concerned about healthy and safe products. Game meat is higher in dietary cholesterol than domestic meats, although the combination of more lean body tissue, less saturated fat, and a significantly higher percentage of cholesterol-reducing polyunsaturated fatty acids, makes wild game a heart-healthy choice (27). Among ruminant bovids, *Rupicapra rupicapra* (chamois) and *Capra pyrenaica* (pyrenean ibex) are phylogenetically close game meat species belonging to the subfamily *Caprinae* (28). In previous studies (18, 29) we reported qualitative PCR-based assays for the identification of game meats, including some *caprinae* species. In the present paper, we describe the development of a real-time PCR approach to quantify the amount of chamois (*R. rupicapra*) and pyrenean ibex (*C. pyrenaica*) DNAs in raw and heat-treated meat mixtures. The assay uses mitochondrial 12S rRNA and D-loop sequences as specific target genes and the fluorescent dye SYBR green as detection platform. A

eukaryotic system based on a nuclear 18S rRNA fragment was used as an endogenous control of the assay. A comparison of the cycle number at which eukaryotic and species-specific PCR products are first detected, in combination with the use of reference standards of known species content, is used as the basis for determining the percentage of a particular species in a mixed sample.

Experimental

Selection of Meat Samples

Authentic muscle samples of chamois (*R. rupicapra*), pyrenean ibex (*C. pyrenaica*), mouflon (*Ovis ammon*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Barcelona, Spain) and from several meat-cutting installations of the Comunidad de Madrid (Parque Natural "El Pardo"), Andalucía (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Asturias, Castilla-La Mancha (Ciudad Real and Toledo), and Extremadura (Badajoz). Cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) muscle samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Each species was morphologically identified before the samples were obtained. Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at -20°C until use.

Two independent binary mixtures of chamois or pyrenean ibex meat in a swine meat matrix were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, different percentages (0.1, 1, 5, 10, and 25 wt/wt) of the corresponding target species in swine meat were prepared to a final weight of 100 g. A 50 mL volume of sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 8.09 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to the *caprinae*/swine mixtures, and homogenized with a blender (Sunbeam Oster, Ft. Lauderdale, FL). A 50 g portion of each mixture was sterilized at 121°C for 20 min to check the effect of thermal treatments on the technique's ability to identify the target species. Raw and sterilized binary meat mixtures were processed directly or stored at -20°C until used.

Table 2. Specificity of quantitative real-time PCR systems

Common name	Scientific name	Chamois-specific PCR system (C_t) ^a	Endogenous PCR system (C_t) T_m ^b 60°C	Pyrenean ibex-specific PCR system (C_t) ^a	Endogenous PCR system (C_t) T_m ^b 55°C
Chamois	<i>Rupicapra</i>	16.03 ± 0.07 ^c	19.79 ± 0.1	33.43 ± 1.05	17.76 ± 0.05
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	40.00 ± 1.20	21.8 ± 0.05	21.85 ± 0.11 ^c	18.6 ± 0.09
Mouflon	<i>Ovis ammon</i>	37.50 ± 0.85	21.67 ± 0.07	33.76 ± 1.15	18.48 ± 0.11
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	37.50 ± 1.15	20.57 ± 0.02	33.99 ± 0.88	18.48 ± 0.04
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	38.25 ± 1.12	21.42 ± 0.09	33.85 ± 0.95	17.78 ± 0.06
Roe deer	<i>Capreolus</i>	38.20 ± 1.35	22.09 ± 0.05	34.02 ± 1.27	17.97 ± 0.05
Cattle	<i>Bos taurus</i>	37.56 ± 1.46	22.5 ± 0.04	33.77 ± 1.07	18.96 ± 0.07
Sheep	<i>Ovis aries</i>	37.60 ± 0.97	20.58 ± 0.12	33.66 ± 1.18	18.85 ± 0.15
Goat	<i>Capra hircus</i>	38.75 ± 1.07	21.59 ± 0.08	33.72 ± 1.27	17.88 ± 0.08
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	37.36 ± 1.57	21.59 ± 0.07	33.82 ± 1.17	18.79 ± 0.09

^a C_t = Threshold cycle; values obtained from 5 (for chamois) and 25 ng (for pyrenean ibex) of DNA.

^b T_m = Melting temperature; different C_t values were obtained for the endogenous system depending on the melting temperature.

^c C_t values obtained for chamois and pyrenean ibex meats in each of the target species-specific PCR system, respectively.

DNA Extraction

DNA was extracted using the Wizard® DNA Clean-up system (Promega, Madison, WI), as described by Fajardo et al. (18). DNA concentration was estimated by UV absorption spectrophotometry at a wavelength of 260 nm.

Primer Design

The primers used in the real-time PCR were designed on the basis of 12S rRNA and D-loop sequences from chamois, pyrenean ibex, mouflon, red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, goat, and swine obtained in previous works (17, 18). A primer pair relying on several conserved 18S rRNA sequences from eukaryotic organisms retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database was designed and used as an endogenous control in order to normalize results obtained with each *caprinae*-specific PCR system.

Based on sequence multialignment, 2 *caprinae* primer sets were selected for the specific quantification of the target species. These primer sets, 12SRPQFW-12SRPQREV (designed in this work) and PIDLOOPFW-PIDLOOPREV (18), were aimed for the specific detection of a 133 and an 88 base pair (bp) fragment in chamois and pyrenean ibex species, respectively. Similarly, the target site for the endogenous PCR system consisted of a 141 bp fragment of the 18S rRNA gene flanked by 18SpEUDIR and 18SpEUIINV primers. The sequences and description of these primers are summarized in Table 1.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for sequence alignment and primer design.

PCR Conditions

The PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar primer concentrations (50, 300, and 900 nM). The concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest threshold cycle (C_t ; data not shown) were 300 nM of specific chamois (12SRPQFW-12SRPQREV) and 900 nM of specific pyrenean ibex (PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV) primer pairs. The endogenous control (eukaryotic) system used 300 nM of forward primer (18SpEUDIR) and 900 nM of reverse primer (18SpEUIINV). The real-time PCR techniques were carried out using the LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR green I (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and 5 or 25 ng DNA from chamois or pyrenean ibex, respectively. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 mL in a glass capillary tube and were run with the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science) with the following program: 10 min at 95°C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 45 cycles at 95°C for 10 s, 60°C (for chamois) or 55°C (for pyrenean ibex) for 5 s, and 72°C for 5 s (for chamois) or 3 s (for pyrenean ibex). The amplification program was then followed with one melting cycle of 95°C for 0 s, 65°C (for chamois) or 60°C (for pyrenean ibex) for 15 s, and 95°C for 0 s (with a transition rate of 0.2°C/s). Samples were then cooled to 40°C for 30 s.

The same program was used to amplify each of the 2 *caprinae*-specific systems along with the endogenous control PCR fragments. Unless otherwise indicated, all real-time PCR techniques were carried out in duplicate.

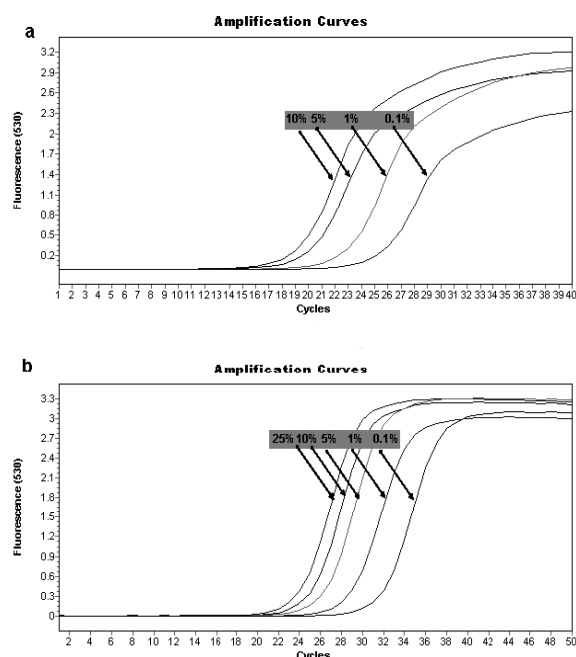


Figure 1. Fluorescent profiles of PCR products generated in duplicate with chamois- or pyrenean ibex-specific PCR systems from the corresponding chamois/swine (a), and pyrenean ibex/swine (b) raw binary mixtures containing 25 (only in b), 10, 5, 1, and 0.1% of the target species, plotted against cycle number.

Construction of the Standard Curve

Raw and sterilized binary mixtures of chamois or pyrenean ibex meat in swine meat were prepared with different percentages of the target species (ranging from 25 to 0.1) and used as standard curve in real-time PCR. From each percentage, 5 ng (chamois) or 25 ng (pyrenean ibex) DNA were included in each amplification reaction.

Data Analysis

The amount of chamois or pyrenean ibex DNA in an unknown sample was measured by interpolation from a standard curve of C_t values generated from known starting DNA concentrations: 5 ng chamois or 25 ng pyrenean ibex DNA extracted from different percentages (ranging from 0.1 to 25) of the experimental *caprinae*/swine meat mixtures. Total DNA quantity in each *caprinae*/swine mixture was determined by reporting the C_t value in the endogenous system (C_{tEUS}); chamois or pyrenean ibex DNA quantity was fixed by reporting the C_t value in the appropriate *caprinae*-specific system (C_{tRPS} for chamois and C_{tPIS} for pyrenean ibex). The C_t corresponding to the percentage of the target *caprinae* DNA in an unknown sample (C_{tRP} or C_{tPI}) was determined as the ratio of the corresponding *caprinae*-specific to total DNA threshold cycles, following previously reported normalization equations (16, 30):

$$C_{tRP} = C_{tEU} * C_{tRPS}/C_{tEUS} \text{ (for chamois samples)}$$

$$C_{tPI} = C_{tEU} * C_{tPIS}/C_{tEUS} \text{ (for pyrenean ibex samples)}$$

where C_{tEU} is the C_t average value of the standard samples (binary mixtures) using 5 ng (chamois) or 25 ng (pyrenean ibex) DNA in the endogenous PCR system; C_{tRPS} or C_{tPIS} is the C_t value of the unknown sample analyzed with the chamois- or pyrenean ibex-specific PCR system, respectively; C_{tEUS} is the C_t value of the unknown sample analyzed with the endogenous PCR system; and C_{tRP} or C_{tPI} is the C_t value corresponding to the percentage of chamois or pyrenean ibex DNA, respectively, of an unknown sample.

The correlation between the variables, (C_t) and concentration ($[]$), is semilogarithmic:

$$C_t = b \log [] + a$$

where b is the slope and a is the intercept.

The specificity of the reaction was verified by melting temperature (T_m) analysis of the amplification products immediately after the last reaction cycle. The T_m , which is specific for each amplicon (65°C for chamois or 60°C for pyrenean ibex), was determined during an additional phase of slow heating. During this period, a rapid decrease in the fluorescence occurred due to the denaturation of the amplicons, such that single-strands of DNA appear with the successive detachment of the SYBR green. The T_m is the temperature at which 50% of the amplicons are associated.

Linearity test, sensitivity, accuracy, and precision parameters of the *caprinae*-specific systems were evaluated according to previously described methods (31, 32). To validate the real-time PCR technique, 3 separate DNA extractions of each percentage of chamois or pyrenean ibex in the corresponding binary *caprinae*/swine mixtures were assayed on different days, using 2 replicates of each sample.

Linearity of the model was verified by Cochran's test, which determines whether the variances of the responses obtained for each concentration of chamois or pyrenean ibex in the mixtures are homogeneous for a 0.05 significance level; and analysis of variance (ANOVA): the F value statistically expresses the regression; the coefficient of correlation, r , statistically expresses the correlation between test results obtained (C_t values) and *caprinae* concentration in the mixtures, and the coefficient of determination, r^2 , quantitatively expresses that correlation. The following parameters were determined for studying the sensitivity of the real-time PCR method (31): calibration sensitivity, which corresponds to the slope of the calibration curve (as it is a linear model); analytical sensitivity, which is the relationship between the randomness of the test results and the modifications due to differences in concentration in the mixture, and calculated as a quotient between the calibration sensitivity and mean standard deviation (SD) for all concentrations; and discriminatory capacity, which represents the least difference in concentration of chamois or pyrenean ibex DNA in the mixture that can be quantified by the analytical method with a significant level. It is calculated as

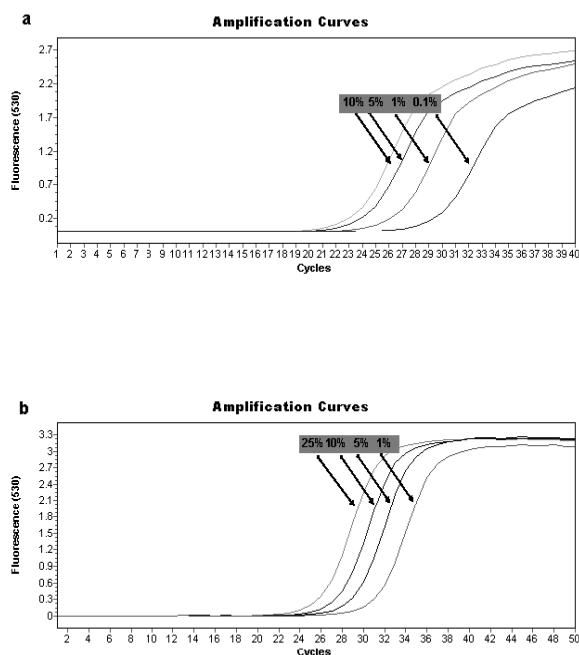


Figure 2. Fluorescent profiles of PCR products generated in duplicate with chamois- or pyrenean ibex-specific PCR systems from the corresponding chamois/swine (a), and pyrenean ibex/swine (b) sterilized binary mixtures containing 25 (only in b), 10, 5, 1, and 0.1% (only in a) of the target species, plotted against cycle number.

the inverse of the analytical sensitivity multiplied by Student's t value with a probability of 0.05 and degrees of freedom corresponding to the number of samples. Analytical sensitivity and discriminating capacity were calculated from an average variance of the response $S^2_{comb.}$, because homogeneous variances were obtained in the linearity test.

$$S^2_{comb.} = \left(\sum (\phi_i \times S_i^2) \right) / (\sum \phi_i)$$

where S_i^2 is the variance of the responses of a certain concentration of the mixture i and ϕ is the degrees of freedom of these responses.

The accuracy of an analytical method expresses the closeness of agreement between the test results obtained by that method and the value which is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value. It should be established across the specified range of the analytical procedure. To test the accuracy of the real-time PCR method, amplification reactions were performed in duplicate using 3 separate DNA extractions of different percentages (1, 5, and 10) from each target species on raw and heat-treated mixtures. The method was considered accurate, when through a Student's t -test, the mean value of recovery was not different from 100% (31, 32).

Precision is the degree of dispersion of the analytical results around one concentration. It indicates the random error

of the method. The precision attributed to the different sources of variation is called repeatability when the method is carried out under the same conditions. Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained on 3 different days versus those obtained in the same day to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained from the meat mixtures (31, 32).

Results and Discussion

Real-Time PCR System Set-Up

The 12S rRNA and D-loop mitochondrial sequences were selected to achieve *caprinae* meat quantification. In the case of chamois, the mitochondrial encoded gene for 12S rRNA was selected because of its adequate length and grade of mutation between related meat species. However, as reported in previous studies (17, 29), the very few 12S rRNA nucleotide differences observed between *C. pyrenaica* and other phylogenetically close species, such as goat (*C. hircus*), impeded use of this marker to accomplish specific and quantitative detection of pyrenean ibex meats. Instead, the highly variable mitochondrial D-loop region was selected to differentiate the latter species because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome (33).

Once the targets were chosen, 2 species-specific primer pairs and a eukaryotic primer set (endogenous control) were combined in a real-time PCR method to develop a robust method for quantitative detection of chamois and pyrenean ibex meats in meat mixtures. With respect to the specific systems, chamois-specific primers (12SRPQFW-12SRPQREV) designed on the 12S rRNA gene amplified a 133 bp fragment in this species, whereas the PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV primer pair amplified a specific 88 bp fragment from pyrenean ibex D-loop region. On the other hand, the endogenous control primer pair (18SpEUDIR-18SpEUINV) was designed to amplify a DNA fragment of 141 bp from all the eukaryotic organisms tested with approximately the same efficiency. The use of an 18S rRNA conserved region as an endogenous control has several purposes. It provides a positive control on the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample, because factors affecting variation of target DNA amplification such as PCR inhibition, degradation, and quality of the DNA recovered from a sample can be taken into account. It also traces the presence of DNA that has not been amplified by the species-specific detectors; and by comparison of species-specific versus endogenous control signal obtained from the samples, the inaccuracies caused by the use of standards and unknowns can be reduced.

It is known that heat and pressure processing treatments applied in some meat products can result in DNA fragmentation, which can, in turn, affect the sensitivity of DNA-mediated analysis. DNA degradation has been shown to cause failures in real-time PCR protocols, mainly when the fragments to be amplified are too large (9). For this reason, assays of food matrixes in which thermal effects or other

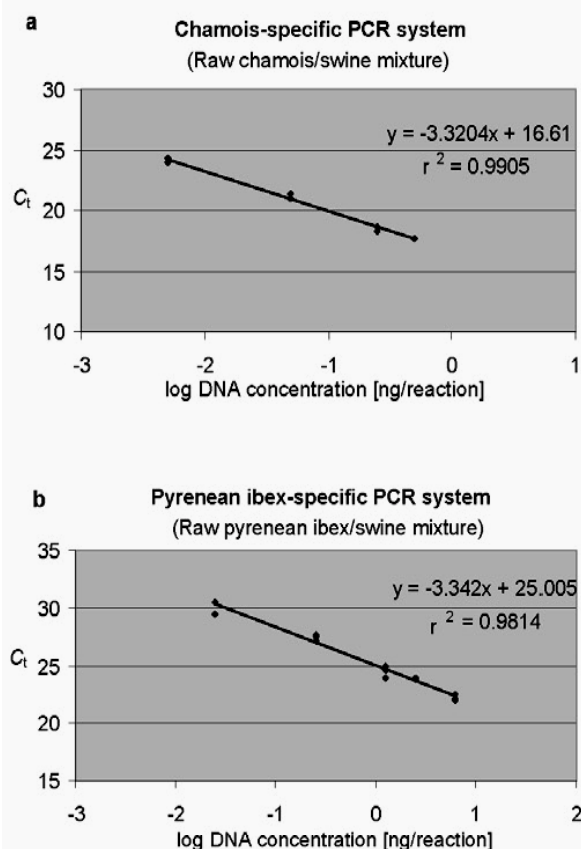


Figure 3. Normalized C_t values obtained from raw meat mixtures of chamois (a) and pyrenean ibex (b) in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters are calculated for each *caprinae*-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of chamois (10, 5, 1, and 0.1) or pyrenean ibex (25, 10, 5, 1, and 0.1%) species in the raw meat mixtures were used as standards. (a) Total number of samples: 12; "G" Cochran: 0.3659*; S^2 comb: 0.0722; ANOVA test "F" regression (1): 625.98**; ANOVA test "F" lack of fit (2): 1.46***; discriminating capacity: 0.055. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P > 0.05$. (1) P value = 0.000; (2) P value = 0.3341. (b) Total number of samples: 15; "G" Cochran: 0.4561*; S^2 comb: 0.1433; ANOVA test "F" regression (1): 684.32**; ANOVA test "F" lack of fit (2): 1.94***; discriminating capacity: 0.119*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P > 0.05$. (1) P value = 0.000; (2) P value = 0.1867.

preservation procedures may degrade the food tissue DNA, should rely preferably on amplification of short DNA fragments (22).

Specificity

Each *caprinae*-specific PCR system was tested for its selectivity and cross-reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. All species were analyzed in duplicate (2 separate extractions and PCR reactions from each species).

The chamois-specific system (12SRPQFW-12SRPQREV) amplified a 133 bp fragment from chamois (C_t value of 16.03 ± 0.07) with a T_m between 77 and 78°C, whereas no amplification was achieved with DNA from other game and domestic meat species, such as mouflon, pyrenean ibex, red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, goat, and swine (Table 2). Under our experimental conditions, C_t values above those corresponding to the mean C_t value of all the nontarget species and negative controls, minus twice their SD ($C_t > 36.37$), were considered negative for the presence of chamois DNA. Similarly, the PIDLOOPQFW/PIDLOOPQREV primer pair amplified a fragment of 88 bp in samples from pyrenean ibex meat (C_t value of 21.85 ± 0.11) with a T_m between 77 and 78°C, showing no cross amplification with DNAs from the rest of the meat species analyzed. In this case, C_t values > 32.80 were considered negative for the presence of pyrenean ibex DNA.

The eukaryotic (endogenous) system amplified a 141 bp fragment from all the eukaryotic species analyzed. With this system, all tested species showed C_t values between 17.76 and 22.5 (Table 2), and a T_m between 85.3 and 87°C.

Efficiency and Quantification Limit

The efficiency and quantification limits of the real-time PCR assay developed were evaluated from the standard curve made with the experimental binary mixtures containing different percentages of either chamois (0.1, 1, 5, and 10) or pyrenean ibex (0.1, 1, 5, 10, and 25) meat in a swine meat matrix. Amounts of 5 ng (chamois/swine) and 25 ng (pyrenean ibex/swine) of DNA from each binary mixture percentages were analyzed with the corresponding species-specific PCR systems, as well as with the endogenous control primer set. Figure 1 shows the fluorescent profiles of the PCR products amplified in the raw binary mixtures with chamois (Figure 1a) and pyrenean ibex (Figure 1b) specific PCR systems, plotted against cycle number. In the chamois-specific system, the binary mixture containing 25% of the target species was not used to construct the standard curve because of saturated fluorescence values generated at this chamois DNA concentration. Fluorescent profiles obtained after real-time PCR analysis of the sterilized *caprinae* binary mixtures followed a pattern similar to that of the raw mixtures (Figure 2). Normalization was carried out on fluorescent results obtained for each percentage with the 2 *caprinae*-specific systems and with the endogenous control, and these data were used as calibration curve for further statistical studies. Results of the efficiency of the PCR approach for raw experimental binary mixtures are shown in Figure 3. The slope of log input amount vs ΔC_t has a value of 3.32 for the chamois-specific system (Figure 3a), and 3.34 for the pyrenean ibex-specific system (Figure 3b), near the value of 3.32 corresponding to a 100% PCR efficiency. Similarly, Figure 4 shows results obtained after analysis of sterilized experimental mixtures.

The quantification limit for each *caprinae*-specific PCR system was also calculated from the standard curves obtained with the experimental binary mixtures shown in Figures 3 and 4. The quantification limit for the

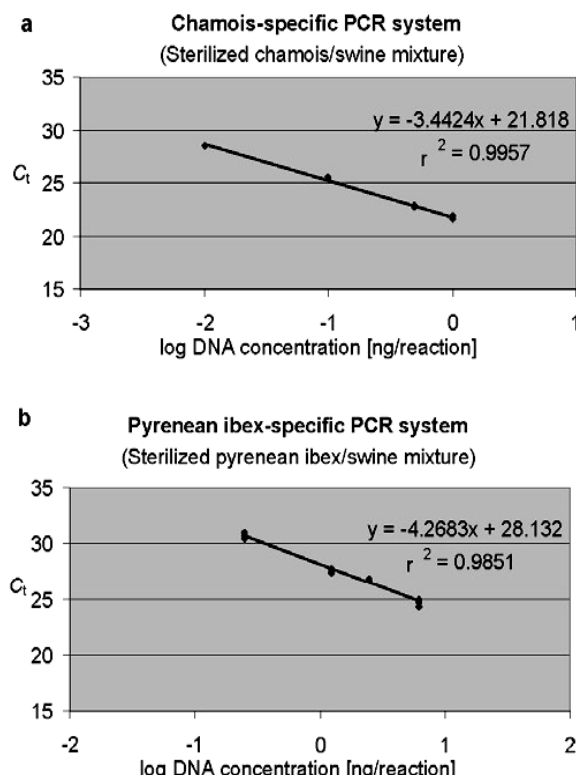


Figure 4. Normalized C_t values obtained from sterilized meat mixtures of chamois (a) and pyrenean ibex (b) in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line, and sensitivity parameters are calculated for each *caprinae*-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of chamois (10, 5, 1, and 0.1) or pyrenean ibex (25, 10, 5, 1, and 0.1) species in the sterilized meat mixtures were used as standards. (a) Total number of samples: 12; "G" Cochran: 0.5460*; S^2 comb: 0.0166; ANOVA test "F" regression (1): 1384.46**; ANOVA test "F" lack of fit (2): 5.28***; discriminating capacity: 0.0154*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P > 0.05$. (1) P value = 0.000; (2) P value = 0.0754. (b) Total number of samples: 12; "G" Cochran: 0.5541*; S^2 comb: 0.0583; ANOVA test "F" regression (1): 660.98**; ANOVA test "F" lack of fit (2): 3.41***; discriminating capacity: 0.043*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P > 0.05$. (1) P value = 0.000; (2) P value = 0.0849.

chamois-specific system was estimated from the chamois standard curve as the DNA amount yielding a C_t value of 36.37 (the mean value less twice the SD of the nontarget species and negative controls). This value was 1.2×10^{-6} ng, which corresponds to $1.2 \times 10^{-5}\%$ chamois DNA in a raw mixture if 5 ng total DNA is used in the assay (Figure 3a). Using the same approach, the quantification limit for pyrenean ibex (C_t value of 32.80) specific system when 25 ng DNA from raw meat mixtures is analyzed corresponded to 0.04% pyrenean ibex DNA (Figure 3b). On the other hand, in sterilized binary mixtures, the quantification limits for chamois and pyrenean ibex-specific

PCR systems were 6×10^{-4} (Figure 4a) and 0.8% (Figure 4b) DNA, respectively. Although sterilization treatment (121°C for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing 6×10^{-4} and 0.8% chamois and pyrenean ibex DNA, respectively. In this context, the targeted amplicons are short enough to minimize sensitivity to degraded DNA templates because of thermal effects or other preservation treatments in food matrixes (34).

The results obtained show the real-time PCR method allows quantification of minute amounts of chamois or pyrenean ibex DNA as long as the reference sample used has received the same treatment as the samples analyzed. Therefore, because of the variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in the real-time PCR assay developed, different calibration curves should be used in accordance with the target species, tissue matrix, and heat treatment applied in order to achieve reliable quantification of *caprinae* meat content in a sample.

Linearity and Sensitivity

Linearity of the chamois and pyrenean ibex real-time PCR response was analyzed for each experimental raw and heat-treated binary mixture. In each case, the following parameters were evaluated: Cochran's test, regression analysis, and variance analysis with lack-of-fit. The results are summarized in Figures 3 and 4.

Normalized C_t values obtained from the raw and heat-treated meat mixtures of chamois and pyrenean ibex in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figures 3 and 4 show the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level.

Accuracy and Precision

The accuracy of the real-time PCR assay was analyzed from 3 meat percentages (10, 5, and 1) of each raw and heat-treated binary mixture sample. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte in the sample. Using the Snedecor F -test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The mean percentage recoveries obtained for chamois and pyrenean ibex raw binary mixtures were 95.33 and 100.65, respectively. The values of the Student's t -test demonstrated that the method was accurate; no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of the day of analysis on the precision study of the assay was also tested by comparing the CVs of 3 separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized *caprinae* binary mixtures, analyzed in duplicate 3 times on the same day, versus the values obtained for the same sample on 3 different days. Results showed significant differences in these evaluations with higher CV values when the assay was done on different days than on the same day.

Thus, for the quantification of chamois and pyrenean ibex DNAs, a standard curve should be determined at each day of analysis.

Real-time PCR technique has been largely used for the detection and quantification of genetically modified organisms (35, 36), but only recently suggested for food species quantification (26). In this context, up-to-date studies have focused on the development of real-time PCR assays for the differentiation and quantitative detection of meat species such as beef, pork, lamb, chicken, turkey, and duck, among others (16, 22, 23, 37). However, a considerably lower number of studies are directed to either qualitative or quantitative PCR detection of less commonly consumed meats such as those from game species (1–3, 38). To our knowledge, no reports are available to date on real-time PCR detection of chamois and/or pyrenean ibex meats.

The main potential advantages of real-time PCR technology is the possibility of performing quantitative measurements at an early stage in the PCR process, which is more precise than the end point analysis typically associated with gel-based measurement. Real-time PCR assays are rapid (LightCycler tests can be completed in 30 to 40 min), and potential contamination of the PCR mixture with target DNA is greatly reduced because the reaction tubes remain closed throughout the assay. On the other hand, the disadvantages of most real-time PCR applications are that the accuracy of the method can be influenced by factors such as the degree of DNA degradation and the presence of different tissue or species types potentially containing different numbers of mitochondria or yielding different amounts of DNA (23). To reduce these limitations, the use of species-specific primers and SYBR green dye was introduced for the detection of PCR products without the need for probes linked to fluorescent molecules (21, 39).

In contrast to Taqman highly specific chemistry, SYBR green allows detecting only double-strand DNA, including nonspecific reaction products. With this method, the evaluation of the dissociation curves allows identification of specific amplicons from other products by their own melting temperatures (40). Specificity can be achieved with SYBR green by careful primer design and reaction optimization, although multiplexing reactions cannot be performed. SYBR green takes advantage of the fact that a specific labeled probe is not required, thus reducing assay set-up and running cost (24, 25, 41).

In conclusion, quantitative PCR using real-time detection appears to be a powerful tool for the authentication of certain game meats that possess a high commercial value and may be targets for illegal market trafficking. In this study, the real-time PCR approach shows a potential alternative for the quantification of minimal amounts of chamois and pyrenean ibex DNA in meats and may provide a tool to certify that the food labeling regulations are applied correctly in meat products.

Acknowledgments

This study was supported by Grant No. AGL 2004-00121 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the

Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Irene Martín is recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We also thank Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), Consuelo Delso (Parque Natural "El Pardo"), and Jordi Romeva Manade (Reserva Nacional de caza de los Puertos de Tortosa-Beceite, Roquetes, Tarragona) for kindly supplying game meat samples. We also appreciate the help provided by Esther Gil Alegre from the Facultad de Farmacia (UCM) with the validation of the analytical methods.

References

- (1) Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350–1355
- (2) Brodmann, P.D., Nicholas, G., Schaltenbrand, P., & Ilg, E.C. (2001) *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 491–496
- (3) Colombo, F., Cardia, A., Renon, P., & Cantón, C. (2004) *Meat Sci.* **66**, 753–755
- (4) Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C. (2005) *Trends Biotechnol.* **23**, 359–366
- (5) Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L., & Demeulemester, C. (2004) *Int. J. Food Sci. Technol.* **39**, 863–867
- (6) Montowska, M., & Pospiech, E. (2007) *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **6**, 5–16
- (7) Renon, P., Bernardi, C., Scocca, S., Cantoni, C., & Gridavilla, G. (2003) *Ind. Aliment.* **42**, 496–500
- (8) Chou, C.C., Lin, S.P., Lee, K.M., Hsu, C.T., Vickroy, T.W., & Zen, J.M. (2007) *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **846**, 230–239
- (9) Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., & Popping, B. (2006) *Food Addit. Contam.* **23**, 645–650
- (10) Rastogi, G., Dharne, M.S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M.S., & Shouche, Y.S. (2007) *Meat Sci.* **76**, 666–674
- (11) Rea, S., Chikuni, K., & Avellini, P. (1996) *J. Food Sci.* **3**, 211–220
- (12) Herman, B.L. (2001) *J. Dairy Res.* **68**, 429–436
- (13) Hopwood, A.J., Fairbrother, K.S., Lockley, A.K., & Bardsley, R.G. (1999) *Meat Sci.* **53**, 227–231
- (14) Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Rocalés, P., López-Pérez, M.J., & Pérez-Martos, A. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2829–2832
- (15) Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Fernández, A., Lobo, E., Hernández, P.E., & Martín, R. (2001) *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2717–2721
- (16) Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P.E., & Martín, R. (2004) *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1478–1483

- (17) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2007) *Meat Sci.* **76**, 234–240
- (18) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2007) *Meat Sci.* **76**, 644–652
- (19) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2006) *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1144–1150
- (20) Calvo, J.H., Osta, R., & Zaragoza, P. (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5265–5267
- (21) Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003) *Food Control* **14**, 579–583
- (22) Dooley, J.J., Paine, K.E., Garret, S.D., & Brown, H.M. (2004) *Meat Sci.* **68**, 431–438
- (23) Laube, I., Zagon, J., & Broll, H. (2007) *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**, 336–341
- (24) Brodmann, P.D., & Moor, D. (2003) *Meat Sci.* **65**, 599–607
- (25) Lopparelli, R.M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V., & Novelli, E.J. (2007) *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3429–3434
- (26) Levin, R.E. (2004) *Food Biotechnol.* **18**, 97–133
- (27) Hoffman, L.C., & Wiklund, E. (2006) *Meat Sci.* **74**, 197–208
- (28) Groves, P., & Shields, E.F. (1996) *Mol. Phylogenet. Evol.* **5**, 467–476
- (29) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2007) *J. AOAC Int.* **90**, 179–196
- (30) Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Hernández, P.E., & Martín, R. (2005) *Meat Sci.* **70**, 113–120
- (31) Camacho, M.A., Torres, A.I., Gil-Alegre, M.E., Obregón, M.M., & Ruiz, V. (1993) *STP Pharma Pratiques* **3**, 197–202
- (32) ICH Harmonized Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland
- (33) Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., & Saccone, C. (1997) *Gene* **205**, 125–140
- (34) Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., Von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., Bove, D., Battaglia, P.A., Agrimi, U., Brambilla, G., Ajmone-Marsan, P., & Tartaglia, M. (2003) *J. Food Prot.* **66**, 103–109
- (35) Pardigol, A., Guillet, S., & Popping, B. (2003) *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 412–420
- (36) Ronning, S.B., Vaitilingom, M., Berdal, K.G., & Holst-Jensen, A. (2003) *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 347–354
- (37) Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M., & Shilton, N. (2001) *Mol. Cell. Probes* **15**, 27–35
- (38) Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004) *Genetics* **5**, 30
- (39) López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006) *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7973–7978
- (40) Walker, J.A., Hughes, D.A., Anders, B.A., Shewale, J., Sinha, S.K., & Batzer, M.A. (2004) *Anal. Biochem.* **316**, 259–269
- (41) López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2007) *Food Control* **18**, 1466–1473

A LightCycler TaqMan® PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures

Violeta Fajardo, *Isabel González, Irene Martín, María Rojas, Pablo E. Hernández, Teresa García and Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Abstract

Accurate quantitative assays are required for enforcing food labeling procedures and preventing food ingredient contamination, misdescription and fraud. Two species-specific TaqMan® systems and a eukaryotic endogenous TaqMan® system were combined in a real time PCR approach to achieve quantification of chamois and pyrenean ibex meats in meat mixtures. The *caprinae*-specific systems were based on the amplification of a 133 bp fragment of the 12S rRNA gene from chamois DNA, whereas an 88 bp fragment from the D-loop region was amplified from pyrenean ibex DNA. Universal primers amplified a 141 bp fragment on the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. The C_t (threshold cycle) values obtained with the 18S rRNA primers are used to normalize those obtained from each of the *caprinae*-specific system, serving as endogenous control for the total content of PCR-amplifiable DNA in the sample. Analysis of experimental raw and heat-treated binary mixtures of chamois and pyrenean ibex meat in a swine meat matrix demonstrated the suitability of the assay for the detection and quantification of the target DNAs in the range of 0.1 – 25%, depending on the species and treatment of the meat samples.

Keywords: Species identification; 12S rRNA; 18S rRNA; D-loop; *caprinae*; chamois; pyrenean ibex; TaqMan®.

INTRODUCTION

Food safety and food quality have become a priority for consumers and producers. Traceability is essential to preserve both safety and quality, becoming particularly necessary to verify the origin of foods with special emphasis in high quality branded products (Dalvit *et al.* 2007). In this context, the meat sector is characterised by the high commercial value of many of its products obtained with the use of a wide variety of technological processes (Pascal & Mahé, 2001). Among meat foodstuffs, game specialties are considered as a delicacy and command a high price compared to other meats due to their particular and intense flavor, the low amount of fat and cholesterol and the high levels of polyunsaturated fatty acids (Wolf *et al.* 1999; Hoffman and Wiklund, 2006). Since detection of intentional or unintentional substitution of high-priced meat for species of less value is a challenging problem in the meat industry, the ability of methods to assess food sources and authenticate delicacy products such as game meats is of prime importance for this sector (Popping, 2002).

In the last decade, PCR-based assays have demonstrated to be highly specific, sensitive and useful tools for the detection of animal species not only in unprocessed foods but also in heat-treated, marinated or fermented samples (Rodríguez *et al.* 2004; Fajardo *et al.* 2006; Sáez *et al.* 2004). Still, the limitations of the standard PCR assays include lack of quantitation of end-point analysis and require postamplification handling of PCR products, thereby extending the risk of laboratory contamination and false-positive results (Herman, 2001; Lahiff *et al.* 2001). Conversely, real-time quantitative PCR is progressively being adopted as a fast, accurate, and specific means for specific identification, providing quantitative measurements and a high degree of automation (Sawyer *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2007).

Different principles are commonly used for real-time PCR detection, being all of them based on the measurement of fluorescence during the PCR. The use of double-stranded DNA intercalating dyes such as SYBR[®] Green, enable simultaneous and rapid detection of the DNA, but lack specificity for the desired target molecule. Post-PCR melting curve analysis of the amplified product is then incorporated in the protocol, so that spurious amplification products are easy to distinguish (Sawyer *et al.* 2003; López-Andreo *et al.* 2006). Another approach for real-time PCR development relies on probe-based chemistries that allow specific detection and quantification of the target by the use of fluorescent labeled sequence specific hybridization probes (Zhang *et al.* 2007). Among them, the TaqMan[®] real-time assay utilizes the 5' nuclease activity of Taq DNA polymerase to hydrolyze an internal fluorogenic probe during the PCR amplification process. The TaqMan[®] probe is doubly labeled with both a reporter dye and a quencher dye and hybridizes to an internal region within the targeted amplicon. As the DNA target is amplified during the extension cycle of the PCR, the 5' nuclease activity of Taq DNA polymerase hydrolyzes the TaqMan[®] probe allowing an increase in reporter dye emission proportional to DNA amplification. With this approach, the specificity of the reaction is increased because the probe will only bind to the desired sequence within the amplicon (López-Calleja *et al.* 2007; Dooley *et al.* 2004).

In a previous study, we reported a real-time PCR-based assay for the quantitative detection of DNA from chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) meats by means of the non-specific fluorescent dye SYBR[®] Green as detection platform (Fajardo *et al.* 2008). In this work, an alternative real-time PCR approach based on the use of species-specific oligonucleotide primers and TaqMan[®] internal probes was developed to detect small quantities of chamois and pyrenean ibex DNAs in raw and heat-treated meat mixtures. The assay relies on mitochondrial 12S rRNA and D-loop sequences as specific target genes and a eukaryotic 18S rRNA system as endogenous control.

EXPERIMENTAL

Meat samples and DNA extraction

Authentic muscle samples of chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis ammon*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) were obtained from different sources (Fajardo *et al.*, 2007b).

Two independent binary mixtures of chamois or pyrenean ibex meat in a swine meat matrix were prepared to contain different percentages (0.1, 1, 5, 10, and 25% wt/wt) of the corresponding target species as described by Fajardo *et al.* (2008).

DNA was extracted with the *Wizard[®] DNA Clean-up system* (Promega, Madison, WI, USA), following a previously described procedure (Fajardo *et al.*, 2006). DNA concentration was estimated by UV absorption spectrophotometry at a wavelength of 260 nm.

Oligonucleotide primers and probes

The primers used for the specific quantification of the target species by the real-time PCR developed were those designed in previous works based on sequence multialignments (Fajardo *et al.* 2007; 2008). These were 12SRPQFW-12SRPQREV and PIDLOOPFW-PIDLOOPREV, aimed for the specific detection of a 133 bp and an 88 bp fragment in chamois and pyrenean ibex species, respectively. Similarly, a 141 bp fragment of the 18S rRNA gene flanked by 18SpEUDIR and 18SpEUINV primers (Fajardo *et al.*, 2008) was used as an endogenous control in order to normalize results obtained with each *caprinae*-specific PCR system.

To accomplish the detection procedure, two specific fluorescent hybridization TaqMan[®] probes were used, one for the chamois and another for the pyrenean ibex PCR system (CHAMOISTM and IBEXTM, respectively). Besides, a third conserved TaqMan[®] probe (18SPROBE) was utilized for the endogenous PCR system. The three TaqMan[®] probes were designed in cooperation with TibMolBiol (Berlin, Germany). The specific CHAMOISTM and IBEXTM probes were based on mitochondrial sequences data obtained in previous works for several meat species (Fajardo *et al.* 2007; 2007b). For the design of the endogenous TaqMan[®] probe, nuclear 141 bp 18S ARNr amplicons were obtained in all the selected meat species with 18SpEUDIR/18SpEUINV primers, and were subsequently purified and sequenced as described previously (Fajardo *et al.*, 2007b). The sequences were published in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database with the following accession numbers: chamois (AM711876), pyrenean ibex (AM711870), mouflon (AM711874), red deer (AM711872), fallow deer (AM711873), roe deer (AM711868), cattle (AM711877), sheep (AM711875), goat (AM711869), and swine (AM711871). Further multialignment of the sequences allowed the design of the TaqMan[®] probe conserved sequence for the endogenous PCR system.

The TaqMan[®] probes (manufactured by TibMolBiol) were aimed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target and were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end, and with the 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) fluorescent quencher dye on the 3' end. The sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 1.

PCR amplification

The PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar primer concentrations (50 nM, 300 nM, and 900 nM).

Table 1. Oligonucleotide primers and TaqMan[®] probes used in this study

Primers/Probes	Length	Sequence (5' to 3')	Description
<i>Chamois specific system</i>			
<i>12SRPQFW</i>	25	GGCGTAAAACGTGTAAAGCAGCTC	Chamois specific forward primer
<i>12SRPQREV</i>	30	TTTGGGTCTTCGCTATAGTGTGTCAGTTAC	Chamois specific reverse primer
<i>CHAMOISTM</i>	30	6FAM-AGCCATAAACTATAACAAAAATAAATGACGA-TMR	Chamois specific TaqMan [®] probe
<i>Pyrenean ibex specific system</i>			
<i>PIDLOOPQFW</i>	26	CCTTCACACAGTTTATTATATGTCGG	Pyrenean ibex specific forward primer
<i>PIDLOOPQREV</i>	26	ACCATAAAATGTAGTGACACATGCC	Pyrenean ibex specific reverse primer
<i>IBEXTM</i>	20	6FAM-CCTACATRCATGCAGTACTA-TMR	Pyrenean ibex specific TaqMan [®] probe
<i>Endogenous system</i>			
<i>18SpEUDIR</i>	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Eukaryotic forward primer
<i>18SpEUINV</i>	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Eukaryotic reverse primer
<i>18SPROBE</i>	28	6FAM-AAGTGGACTCATTCCAATTACAGGGCCXT—TMR	Eukaryotic TaqMan [®] probe

The concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest C_t (data not shown) were 300 nM and 900 nM of specific chamois forward (12SRPQFW) and reverse (12SRPQREV) primers, respectively, and 900 nM of specific pyrenean ibex (PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV) primer pair. The endogenous control (eukaryotic) system used 300 nM of forward primer (18SpEUDIR) and 900 nM of reverse primer (18SpEUINV). The real-time PCR reactions were carried out using the LightCycler[®] TaqMan[®] Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan[®] probe (TibMolBiol), and 5 or 25 ng of DNA from chamois or pyrenean ibex, respectively. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 μ L in a glass capillary tube and were run on the LightCycler[®] 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Pensberg, Germany) with the following program: 10 min at 95 °C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C (for chamois) or 55 °C (for pyrenean ibex) for 30 s, and 72 °C for 1 s.

The same program was used to amplify each of the two *caprinae*-specific systems along with the endogenous control PCR fragments. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

Construction of the standard curve

Raw and sterilized binary mixtures of chamois or pyrenean ibex meat in swine meat were prepared with different percentages of the target species (ranging from 25% to 0.1%) and used as standard curve in real-time PCR. From each percentage, 5 ng (chamois) or 25 ng (pyrenean ibex) of DNA were included in each amplification reaction.

Data analysis

The amount of chamois or pyrenean ibex DNA in an unknown sample was measured by interpolation from a standard curve of C_t values generated from known starting DNA concentrations: 5 ng of chamois or 25 ng of pyrenean ibex DNAs extracted from different percentages (ranging from 0.1 to 25%) of the experimental *caprinae*/swine meat mixtures. Total DNA quantity in each *caprinae*/swine mixture was determined by reporting the C_t value in the endogenous system (C_{tEUS}), whilst chamois or pyrenean ibex DNA quantity was fixed by reporting the C_t value in the appropriate *caprinae*-specific system (C_{tRPS} for chamois and C_{tPIS} for pyrenean ibex). The C_t corresponding to the percentage of the target *caprinae* DNA in an unknown sample (C_{tRP} or C_{tPI}) was determined as the ratio of the corresponding *caprinae*-specific to total DNA threshold cycles, following previously reported normalization equations (Fajardo *et al.*, 2008):

$$C_{tRP} = C_{tEU} * C_{tRPS} / C_{tEUS} \text{ (for chamois samples)}$$

$$C_{tPI} = C_{tEU} * C_{tPIS} / C_{tEUS} \text{ (for pyrenean ibex samples)}$$

where C_{tEU} is the threshold cycle average value of the standard samples (binary mixtures) using 5 ng (chamois) or 25 ng (pyrenean ibex) of DNA in the endogenous PCR system; C_{tRPS} or C_{tPIS} is the C_t value of the unknown sample analyzed with the chamois or pyrenean ibex specific PCR system, respectively; C_{tEUS} is the C_t value of the unknown sample analyzed with the endogenous PCR system, and C_{tRP} or C_{tPI} is the C_t value corresponding to the percentage of chamois or pyrenean ibex DNA, respectively, of an unknown sample.

The correlation between the variables, threshold cycle (C_t) and concentration ($[]$) is semilogarithmic:

$$C_t = b \log [] + a$$

where b is the slope and a is the intercept.

A validation protocol of linearity test, regression line, sensitivity and precision parameters of the *caprinae*-specific real-time PCR systems were evaluated as previously described (Camacho *et al.*, 1993; ICH, 2005; Fajardo *et al.*, 2008).

To carry out the validation of the real-time PCR technique, three separate DNA extractions of each percentage of chamois or pyrenean ibex in the corresponding binary *caprinae*/swine mixtures were assayed in different days, using two replicates of each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Real-time PCR system set-up

In an effort to improve the quantitative detection of chamois and pyrenean ibex in meat mixtures, two *caprinae*-specific primer pairs and a eukaryotic primer set previously used in a real-time SYBR[®] Green PCR method (Fajardo *et al.*, 2008) were adapted to a probe-based real-time PCR format. The developed

assay uses hydrolysis TaqMan[®] probes designed complementary to internal *caprinae*-specific mitochondrial DNA sequences flanked by the primers.

The chamois-specific primers (12SRPQFW-12SRPQREV) designed on the 12S rRNA gene (Fajardo *et al.*, 2008) amplify a 133 bp fragment in this species, whereas the PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV primer pair amplifies a specific 88 bp fragment from pyrenean ibex D-loop region (Fajardo *et al.*, 2007). Two specific fluorescently labeled TaqMan[®] probes, CHAMOISTM and IBEXTM, were used in the corresponding *caprinae*-specific PCR systems for chamois and pyrenean ibex meats detection, respectively.

Besides the species-specific TaqMan[®] PCR systems, endogenous control primers designed on the 18S ARNr (18SpEUDIR-18SpEUINV) were used together with the conserved TaqMan[®] probe (18SPROBE) to detect, with approximately the same efficiency, a DNA fragment of 141 bp from all the eukaryotic organisms tested. A number of authors have considered sources of error in interpreting positive amplification results, particularly with regard to false positives from nucleic acid contamination. However, less attention has been given to false negative reactions. False negatives can be the result of failed PCR reactions due to expired reagents, poor technique, equipment deficiency or presence of nucleic acid inhibitors. To reveal possible failures in amplification reactions and improve quantification of DNA from different species in food products, the use of an endogenous control PCR is recommended (López-Andreo *et al.*, 2005; Hoorfar *et al.*, 2004). The eukaryotic system used in this work allows to have a measurement of the total amplifiable DNA present in the sample, as well as to normalize the results obtained with the specific probes.

Because heat degradation of DNA may occur under processing treatments applied to some meat products, it is essential to choose short amplicon sizes to obtain consistent PCR amplification results (Hird *et al.* 2006). The quantitative real-time TaqMan-based assay reported in this work takes advantage of the detection of small-size DNA amplified fragments (133, 88 and 141 bp), which means that it is feasible to characterize and quantify DNA from highly degraded sources (Zhang *et al.* 2007; Rodríguez *et al.* 2005).

Specificity

Each *caprinae*-specific PCR system was tested for their selectivity and cross-reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. All species were analyzed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

The chamois-specific system (12SRPQFW-12SRPQREV primers and CHAMOISTM probe) amplified a 133 bp fragment from chamois (C_t value of 17.65 ± 0.14), whereas no detection signal was achieved with DNA from other game and domestic meat species like mouflon, pyrenean ibex, red deer, fallow deer, roe deer, cattle, sheep, goat, and swine meat samples. A C_t value of 45.0 is measured if no amplification signal is detected after 45 cycles. Similarly, the PIDLOOPQFW/PIDLOOPQREV primer pair together with the IBEXTM probe detected a fragment of 88 bp in samples from pyrenean ibex meat (C_t value of 19.90 ± 0.32), showing no cross amplification with DNAs from the rest of the meat species analyzed. TaqMan[®] approaches require the effective binding of a specific probe in addition to the binding

of the specific PCR primers, increasing the reaction specificity, which usually does not require any further analysis (Sawyer *et al.*, 2003; López-Andreo *et al.*, 2006). Compared with a previously reported SYBR® Green real-time PCR study (Fajardo *et al.*, 2008), the specificity of the method has further been enhanced thanks to the use of a target-specific TaqMan® probe in each of the *caprinae* PCR systems.

In both systems, the eukaryotic primers (18SpEUDIR/18SpEUINV) and probe (18SPROBE) detected a 141 bp fragment from all the species analyzed. With this system, all tested species showed C_t values between 16.68 and 17.90.

Efficiency and quantification limit

The efficiency and quantification limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the standard curve made with the experimental binary mixtures containing different percentages of either chamois (0.1, 1, 5, and 10%) or pyrenean ibex (0.1, 1, 5, 10, and 25%) meat in a swine meat matrix. 5 ng (chamois/swine) and 25 ng (pyrenean ibex/swine) of DNA from each binary mixture percentages were analyzed with the corresponding species-specific and endogenous TaqMan® PCR systems. Figure 1 shows the fluorescent profiles of the PCR products amplified in the raw binary mixtures with chamois (1a) and pyrenean ibex (1b) specific TaqMan® PCR systems, plotted against cycle number. It should be noted that in the chamois-specific system, the binary mixture containing 25% of the target species was not used to construct the standard curve, due to saturated fluorescence values generated at this chamois DNA concentration. Fluorescent profiles obtained after real-time PCR analysis of the sterilized *caprinae* binary mixtures follow a similar pattern to that of the raw mixtures (not shown). Normalization was carried out on fluorescent results obtained for each percentage with the two *caprinae*-specific systems and with the endogenous control, and these data were used as calibration curve for further statistical studies. Results of the efficiency of the PCR approach for raw experimental binary mixtures are shown in Fig. 2. The slope of log input amount vs. ΔC_t has a value of -3.31 for chamois-specific system (2a), and -3.22 for pyrenean ibex-specific system (2b), near to the value of -3.32 corresponding to a 100% PCR efficiency. Similarly, Figure 3 shows results obtained after analyzing sterilized experimental mixtures.

The quantification limit for each *caprinae*-specific PCR system was also calculated from the standard curves obtained with the experimental binary mixtures shown in Figs 2 and 3. The quantification limit for the chamois-specific system was estimated from the chamois standard curve as the DNA amount yielding a C_t value of 45 (the mean value less twice the standard deviation (SD) of the non-target species and negative controls). This value was 4.2×10^{-9} ng, which corresponds to 4.2×10^{-8} % chamois DNA in a raw mixture if 5 ng of total DNA are used in the assay (Fig. 2a). Using the same approach, the quantification limit for pyrenean ibex (C_t value of 45) specific system when analyzing 25 ng of DNA from raw meat mixtures corresponded to 2.8×10^{-6} % pyrenean ibex DNA (Fig. 2b). On the other hand, in sterilized binary mixtures, the quantification limits for chamois and pyrenean ibex specific PCR systems were 2.2×10^{-6} (Fig. 3a) and 4.2×10^{-5} (Fig. 3b) % DNA, respectively. It should be noted that although sterilization treatment (121 °C for 20 min) may reduce the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing 2.2×10^{-6} and 4.2×10^{-5} % of chamois and pyrenean

ibex DNA, respectively. It is widely reported that the intensity of the heating and pressure of food processing treatments such as sterilization clearly affects DNA fragmentation and can lead to false-negative results (Hird *et al.* 2006). In the present work, the length of the amplified DNA fragments minimized sensitivity to degraded DNA templates.

It can be assumed that the real-time PCR method developed allows quantification of minute amounts of chamois or pyrenean ibex DNA as long as the reference sample used has received the same treatment than the samples analyzed. So, because of the variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in the real-time PCR assay developed, different calibration curves should be used in accordance with the target species, the tissue matrix and the heat treatment applied in order to achieve reliable quantification of *caprinae* meat content in a sample.

Linearity and sensitivity

Linearity of the chamois and pyrenean ibex real-time PCR response was analyzed for each experimental raw and heat-treated binary mixture. In each case, *Cochran's* test, regression analysis, and variance analysis with Lack of-Fit parameters were evaluated following previous validation protocols (Camacho *et al.*, 1993; ICH, 2005; Fajardo *et al.*, 2008). The results are summarized in Figs 2 and 3.

Normalized C_t values obtained from the raw and heat-treated meat mixtures of chamois and pyrenean ibex in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figures 2 and 3 show the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level.

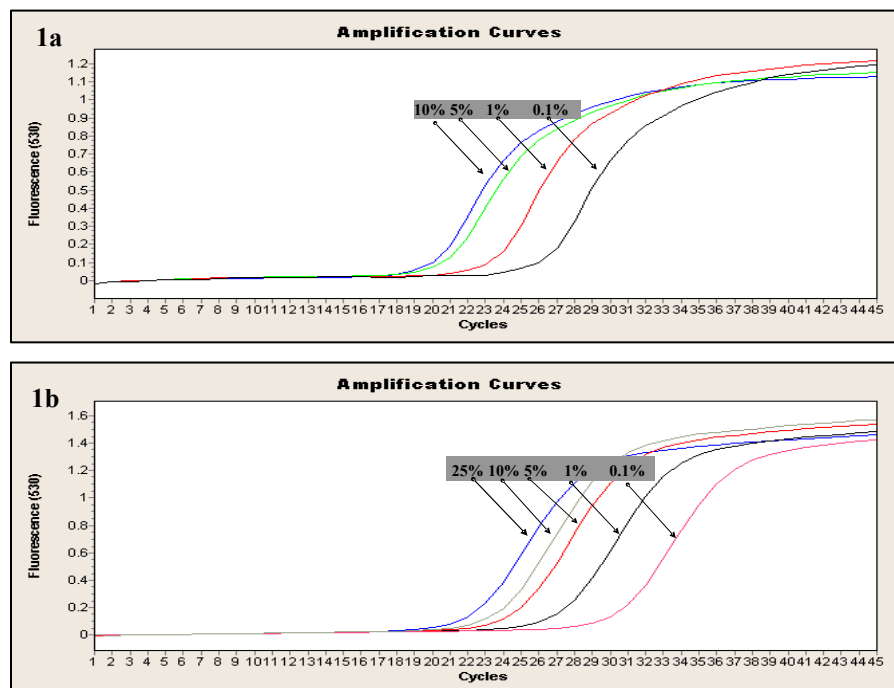


Fig. 1. Fluorescent profiles of PCR products generated in duplicate with the chamois or pyrenean ibex-specific PCR systems from the corresponding chamois/swine (1a) and pyrenean ibex/swine (1b) raw binary mixtures containing 25 (only in 1b), 10, 5, 1, and 0.1% of the target species, plotted against cycle number.

Accuracy and precision

The accuracy of the real time PCR assay was analyzed from three meat percentages (10, 5 and 1%) of each raw and heat-treated binary mixture samples. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte in the sample. Using the Snedecor F-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values of the Student's *t*-test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of the day of analysis on the precision study of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized *caprinae* binary mixtures, analyzed in duplicate three times in the same day, versus the values obtained for the same sample in three different days. Results did not show significant differences in these evaluations with similar CV values when the assay was done in different days with respect to the same day.

There is a growing need to develop techniques that allow the correct identification and traceability of meat and meat products in order to satisfy the requirements of current legislation (Dalvit *et al.* 2007). DNA-based markers have shown to be very useful for this purpose, mainly because the generalized use of amplified products by PCR has simplified the technology (Woolfe and Primose, 2004).

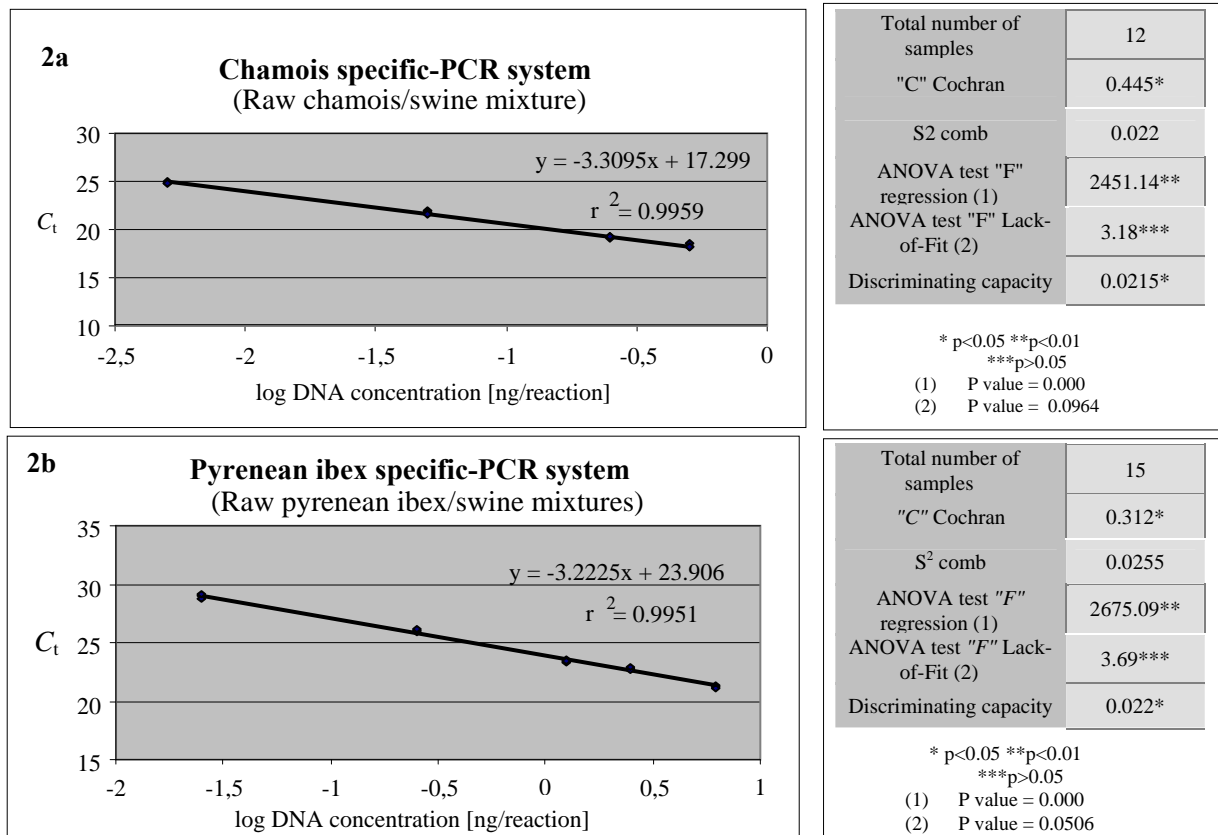


Fig. 2. Normalized C_t values obtained from raw meat mixtures of chamois (2a) and pyrenean ibex (2b) in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each *caprinae*-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of chamois (10, 5, 1 and 0.1%) or pyrenean ibex (25, 10, 5, 1, and 0.1%) species in the raw meat mixtures were used as standards.

The recently-introduced real-time PCR-based fluorescence technologies have many advantages: high sensitivity and specificity, usefulness as quantitative assays, operation in a closed system avoiding contamination and ability to yield automated results rapidly (Laube *et al.* 2007; Sawyer *et al.* 2003). A major highly sensitive aspect of real-time PCR is the use of fluorescent reporter dyes that undergo enhanced fluorescence when bound to DNA. The fluorescent reporter systems currently employed include SYBR[®] Green, as well as the molecular probes designated TaqMan[®], FRET, molecular beacons, and variations of these systems (López-Andreo *et al.* 2006; Fajardo *et al.* 2008).

TaqMan[®] chemistries allow specific sequence detection and quantification by use of fluorescently labeled sequence-specific hybridization probes (Dooley *et al.* 2004). This technique permits the design of very small amplicons which can amplify efficiently and improve detection, particularly when enhanced sensitivity is required (López-Andreo *et al.* 2005). To increase the performance of a previously reported real-time method which employ SYBR[®] Green (Fajardo *et al.* 2008), we conducted the reoptimization of PCR conditions to suit a TaqMan[®] chemistry for detection of small amounts of chamois and pyrenean ibex DNAs in meat mixtures. Results reported herein demonstrated that the use of TaqMan[®] probes as detection system increased the specificity, efficiency and sensitivity of the real-time PCR assay in comparison with the antecedent SYBR[®] Green approach (Fajardo *et al.* 2008). The main advantage of the TaqMan[®] real-

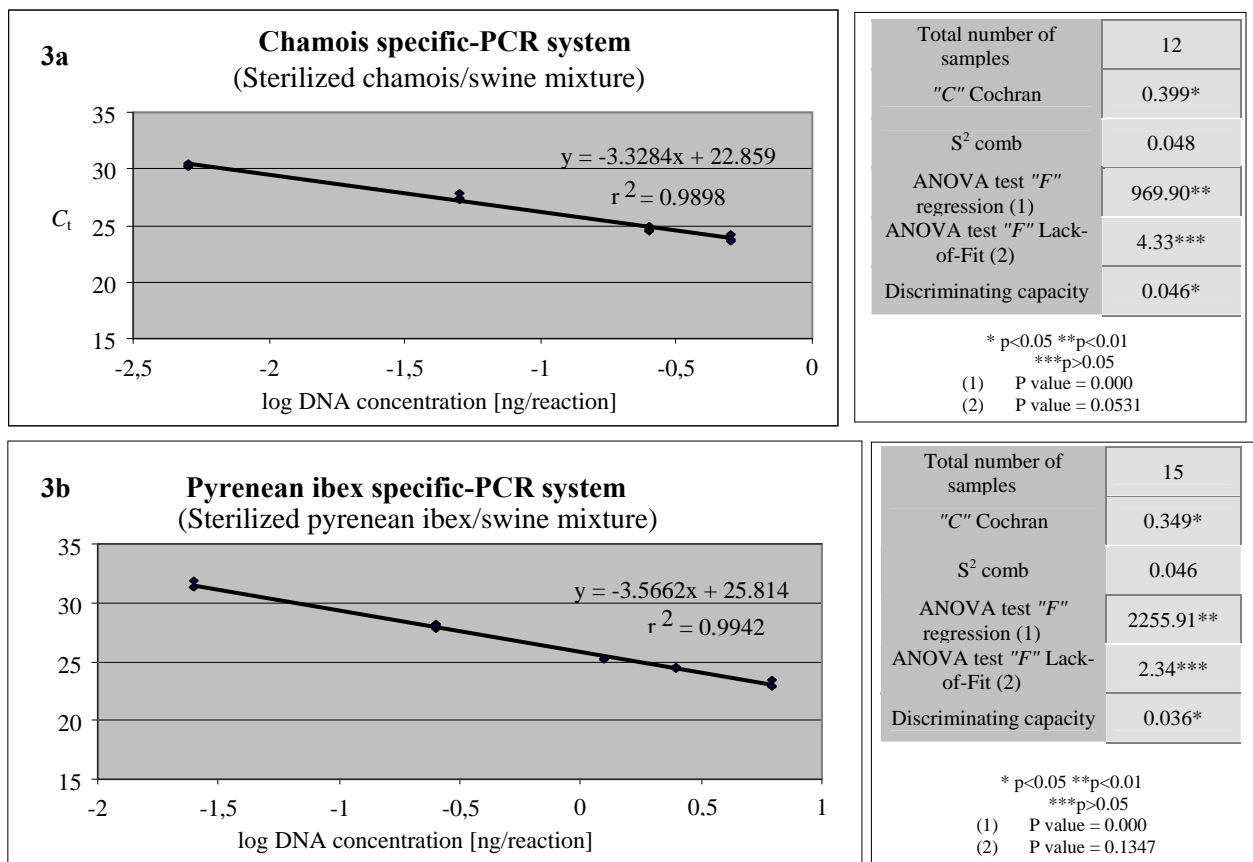


Fig. 3. Normalized C_t values obtained from sterilized meat mixtures of chamois (3a) and pyrenean ibex (3b) in swine, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each *caprinae*-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of chamois (10, 5, 1 and 0.1%) or pyrenean ibex (25, 10, 5, 1, and 0.1%) species in the sterilized meat mixtures were used as standards.

time PCR assay developed is the high specificity and sensitivity, showing a limit of detection of 0.1% of the target species DNAs in both raw and heat-treated meat mixtures. However, it should also be considered the relatively high cost of TaqMan[®] based approaches compared to other real-time PCR chemistries. Besides, the application of TaqMan[®] assays require the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid conditions, which cannot always be easily met.

In conclusion, the real-time TaqMan[®] assay developed in this study has proven as a suitable alternative to the SYBR[®] Green system for the quantification of minimal amounts of chamois and pyrenean ibex DNAs in meat. The sensitivity, high specificity and reproducibility of the optimized procedure suggest that it may be a feasible and ideal PCR-based tool for routine analysis to test fresh and processed meat products.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant no. AGL 2004-00121 and no. AGL2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria* S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). Violeta Fajardo and María Rojas are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Irene Martín is recipient of a fellowship from the Universidad Complutense de Madrid (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), Mr. Francisco Martínez Fernández (Parque Natural Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas), Mr. Luis Javier Camarena (Servicios Veterinarios, Castilla-La Mancha), Mrs. Consuelo Delso (Parque Natural “El Pardo”), and Mr. Jordi Romeva Manade (Reserva Nacional de caza de los Puertos de Tortosa-Beceite, Roquetes, Tarragona) for kindly supplying game meat samples.

We appreciate the help provided by Dr. Esther Gil Alegre from the Facultad de Farmacia (UCM) with the validation of the analytical methods. We are also grateful to TIB-MolBiol Syntheselabor GmbH for kindly designing of the TaqMan[®] probes.

REFERENCES

- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197-202.
- Dalvit, C., De Marchi, M., & Cassandro, M. (2007). Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*, 77, 437-449.
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garret, S. D., Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431-438.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144-1150.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop. *Meat Science*, 76, 644-652.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007b). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of AOAC International*, 90, 179-196.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2008). Real-Time PCR for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. *Journal of AOAC International*, 91, 103-111.
- Herman, B. L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 429-436.
- Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., & Popping, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 23, 645-650.

- Hoffman, L. C., & Wiklund, E. (2006). Game and venison-meat for the modern consumer. *Meat Science*, 74, 197-208.
- Hoofar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1863-1868.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
- Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M., & Shilton, N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes*, 15, 27-35.
- Laube, I., Zagon, J., & Broll, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 336-341.
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73-82.
- López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7973-7978.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18, 1466-1473.
- Pascal, G., & Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology*, 47, 1329-1342.
- Popping, B. (2002). The application of biotechnological methods in authenticity testing. *Journal of Biotechnology*, 98, 107-112.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., & Martín, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*, 67, 172-177.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Hernández, P. E., & Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantification of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113-120.
- Sáez, R., Sanz, Y., & Toldrá, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*, 66, 659-665.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579-583.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350-1355.
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222-226.
- Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks, and cheeses. *Food Control*, 18, 1149-1158.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS y DISCUSIÓN



IV.1. AUTENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE ESPECIES DE CAZA MAYOR POR TÉCNICAS GENÉTICAS

La determinación del origen de las materias primas e ingredientes de los alimentos es un requisito fundamental para cumplir con las exigencias legales de etiquetado y trazabilidad. Concretamente, en los productos cárnicos procedentes de especies de caza mayor, son relativamente frecuentes los fraudes de sustitución de las especies más valoradas por otras de precio inferior, o la declaración de porcentajes de mezclas diferentes de los utilizados en su elaboración. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos rápidos y fiables que garanticen la autenticidad de los productos comercializados (Brodmann y col., 2001; Mafra y col., 2008).

La metodología convencional utilizada para la identificación de especies ha estado predominantemente basada en el análisis de proteínas. Actualmente, el análisis del ADN y, concretamente, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una atractiva estrategia para la identificación de especies, ya que son rápidas, pueden diferenciar especies estrechamente relacionadas filogenéticamente y permiten el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos (Tingey y col., 2003; Teletchea y col., 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido, con diferencia, la herramienta que ha permitido una mayor expansión de las técnicas genéticas. Hasta su descubrimiento en la década de los 80, si se quería obtener un determinado fragmento de ADN en cantidad suficiente para su análisis, el único camino viable era seguir laboriosos y lentos procedimientos de clonación. La técnica de PCR, sin embargo, permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Por ello, esta técnica ha causado un profundo impacto en todas las áreas de investigación biológica y biomédica y se emplea en multitud de aplicaciones: diagnóstico de enfermedades genéticas y hereditarias, detección de infecciones microbianas, estudios de evolución molecular, medicina forense, identificación de especies y detección de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Kimura y col., 2001; Nicolas y col., 2002; Aslam y col., 2003; Bellis y col., 2003; O'Grady y col., 2008).

En el campo de la identificación de especies animales en los alimentos, la técnica de PCR se ha empleado bien de forma directa (Herman y col., 2001; Ha y col., 2006; Tobe y col., 2008) o complementada con otras técnicas como la secuenciación (Hsieh y col., 2001; Girish y col., 2004), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) (Maede, 2006; Park y col., 2007), el análisis de polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN (PCR-SSCP) (Otaviano y col., 2005; Rasmussen y col., 2008) o el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) (Sáez y col., 2004; Arslan y col., 2005), entre otras. En este sentido, las técnicas de PCR se han utilizado para la determinación del origen animal en alimentos como la

leche y productos lácteos (De la Fuente y Juárez, 2005; Mayer, 2005; Lanzilao y col., 2005; López-Calleja 2005a, b; López-Calleja y col., 2007), el pescado y productos de la pesca (Asensio y col., 2001; Brzenzinski y col., 2005; Sezaki y col., 2005; Santaclara y col., 2007) y la carne y productos cárnicos (Colgan y col., 2001; Pascoal y col., 2004; Sáez y col., 2004; Di Pinto y col., 2005; Park y col., 2007). En el caso de la carne y productos cárnicos, existe un cuantioso número de estudios dirigidos a la identificación de especies domésticas de consumo habitual (Girish y col., 2004; Rodríguez y col., 2004; López-Andreo y col., 2005, 2006; Jonker y col., 2008). Sin embargo, cabe señalar que las publicaciones existentes hasta el momento en el área de identificación genética de especies de caza mayor son, comparativamente, mucho más escasas (Wolf y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Rajapaksha y col., 2002). Por ello, este trabajo de investigación se ha centrado en la puesta a punto de diversas técnicas genéticas para la detección e identificación de especies de caza mayor como ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés, muflón y jabalí en carnes frescas y tratadas por calor. Asimismo, se ha abordado la diferenciación de estas carnes de otras procedentes de especies domésticas como vaca, oveja, cabra y cerdo.

Para conseguir el objetivo planteado en este trabajo ha sido necesario: 1) Seleccionar marcadores genéticos con un grado de variabilidad genética intra- e interespecífica adecuado y diseñar cebadores conservados que amplifiquen el ADN procedente de todas las especies de interés; 2) Secuenciar los fragmentos de ADN amplificados para encontrar diferencias nucleotídicas que posibiliten: a) la selección de endonucleasas de restricción para el análisis por RFLP y b) el diseño de cebadores específicos; 3) Desarrollar técnicas de PCR-RFLP convencional y PCR-RFLP *lab-on-a-chip* que permitan la identificación específica de carnes procedentes de todas las especies de interés; 4) Emplear técnicas de PCR con cebadores específicos para la identificación de las especies de caza mayor objeto de estudio en mezclas cárnicas crudas y sometidas a tratamientos térmicos; y 5) Desarrollar técnicas de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de las especies elegidas en mezclas cárnicas crudas y esterilizadas.

IV.1.1. TÉCNICA DE PCR-RFLP

Autenticación de carnes procedentes de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) mediante una técnica de PCR-RFLP

El objetivo de este trabajo de investigación ha consistido en el desarrollo de una técnica de PCR-RFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR) para la identificación de carnes procedentes de ciervo, gamo y corzo, así como para su diferenciación de otras especies comerciales como vaca, oveja y cabra. Como marcador genético se eligió el gen mitocondrial 12S ARN ribosómico (ARNr), ya que presenta una longitud y una tasa de mutación adecuadas para hacer posible la discriminación de

especies estrechamente relacionadas (Awise y col., 1987; Kocher y col., 1989; Girish y col., 2004).

En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos conservados 12S-FW y 12S-REV teniendo en cuenta las secuencias del gen 12S ARNr disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*) para varias especies de mamíferos. Estos cebadores se emplearon en una técnica de PCR para la amplificación de un fragmento conservado de 712 pb en el gen 12S ARNr, a partir del ADN extraído de tejido muscular de ciervo, gamo, corzo, vaca, oveja y cabra. Una vez amplificado el ADN, se purificó y secuenció el fragmento de 712 pb del gen 12S ARNr en al menos 11 individuos de cada especie. Los resultados obtenidos revelaron la existencia de varios polimorfismos nucleotídicos en algunos individuos de ciervo y corzo, lo que originó más de un tipo de secuencia en estas especies, concretamente tres para el ciervo y cinco para el corzo. Las secuencias obtenidas del fragmento conservado de 712 pb se registraron en la base de datos *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) con los siguientes números de acceso: AJ885204, AJ885205, AJ885206 (ciervo); AJ885203 (gamo); AJ885202, AJ972679, AJ972680, AJ972681, AJ972682, AJ972683 (corzo); AJ885201 (vaca); AJ885200 (oveja) y AJ885199 (cabra).

La información contenida en las secuencias permitió elaborar los mapas de restricción de todas las especies objeto de estudio, seleccionándose las enzimas *MseI* y la combinación de las enzimas *MbolI*, *BstI* y *ApoI*, para llevar a cabo su diferenciación por PCR-RFLP. En la *Figura 1* del artículo (pág. 77-78) se muestra el alineamiento de las secuencias del gen 12S ARNr de ciervo, gamo, corzo, cabra, vaca y oveja y aparece marcada la posición de las dianas de restricción de cada una de las endonucleasas seleccionadas.

Las *Figuras 2 y 3* (pág. 79 y 80, respectivamente) incluyen los perfiles electroforéticos generados tras la digestión con las enzimas elegidas de los amplicones procedentes de 25 individuos de cada especie. El tamaño y los patrones de bandas obtenidos concordaron con los esperados (*Tabla 1*, pág. 79) de acuerdo al análisis de los mapas de restricción. Como muestra la *Figura 2* (pág. 79), al emplear la enzima *MseI* en la técnica de PCR-RFLP desarrollada se obtuvieron perfiles de restricción especie-específicos. No obstante, debido al polimorfismo intraespecífico detectado, esta enzima generó dos patrones electroforéticos diferentes tanto en ciervo como en corzo. Así, en las muestras de ciervo se obtuvieron dos perfiles, el A con 9 fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 388 y 10 pb (línea 2), y el B con 10 fragmentos de ADN de 257 a 10 pb (línea 2b). De forma similar, las digestiones de las muestras de corzo dieron lugar a dos patrones diferentes con bandas de entre 224 y 10 pb: perfil A, con 12 fragmentos de ADN (línea 4a) y B, con 11 fragmentos de ADN (línea 4b). Las muestras de gamo y oveja, originaron ocho fragmentos de 388 a 10 pb, y de 407 a 4 pb respectivamente. En el caso de la vaca, la enzima *MseI* cortó el ADN en 7 fragmentos de 379 a 23 pb. Finalmente, la digestión de los productos de PCR de cabra originó 9 fragmentos de 397 a 9 pb. Conviene

destacar que aunque la resolución del gel no permite visualizar los fragmentos menores de 50 pb resultantes de las digestiones enzimáticas, el número y el tamaño de las bandas de ADN que se observan en el gel de agarosa son suficientes y adecuados para la identificación de cada una de las especies seleccionadas.

La ventaja de utilizar la enzima *MseI* en la técnica de PCR-RFLP descrita en este trabajo reside en que en un sólo paso es posible diferenciar las seis especies objeto de estudio. No obstante, debido a que esta endonucleasa posee numerosos sitios de reconocimiento, los perfiles de restricción a los que da lugar contienen un elevado número de fragmentos de ADN que pueden dificultar la interpretación de los resultados. Esta característica también favorece la posibilidad de que las mutaciones puntuales presentes en el gen diana afecten a los lugares de corte de la enzima, pudiendo originarse más de un perfil de restricción característico para una misma especie, como ocurre en ciervo y corzo.

En este estudio, también se utilizó la combinación de las enzimas *MbolI*, *BsII* y *ApoI* en reacciones de restricción independientes para la diferenciación de las especies objeto de estudio. Como muestra la *Figura 3* (pág. 80), las digestiones de los productos de PCR del gen 12S ARNr de ciervo, gamo, corzo, cabra, vaca y oveja con las enzimas elegidas originaron perfiles electroforéticos especie-específicos. La presencia de una diana de restricción de la enzima *MbolI* en los productos de PCR de ciervo y gamo, dio lugar a dos fragmentos de ADN de 384/328 pb y 489/223 pb, respectivamente. Las muestras de corzo, oveja, cabra y vaca, con dos puntos de corte para esta enzima, produjeron tres fragmentos de 384, 223 y 105 pb (*Figura 3a*). Por otro lado, la enzima *BsII* originó cinco fragmentos de ADN de 223, 191, 126, 92 y 80 pb en las muestras de gamo y ciervo. Los fragmentos producidos en las muestras de cabra fueron de 240, 191, 126, 92 y 63 pb. En el corzo, vaca y oveja, esta enzima cortó los productos de PCR en cuatro fragmentos de ADN de 303, 191, 126 y 92 pb (*Figura 3b*). Por último, la presencia de dos dianas de restricción para la enzima *ApoI* en los productos de PCR de ciervo y gamo dio lugar a tres fragmentos de ADN de 553, 96 y 63 pb, mientras que en las muestras de oveja los fragmentos obtenidos fueron de 412, 204 y 96 pb. Las muestras de corzo, con un punto de corte para la enzima *ApoI*, originaron fragmentos de 649 y 63 pb. Finalmente, los productos de PCR de vaca y cabra, con una diana de restricción para esta enzima, dieron lugar a dos fragmentos de 616 y 96 pb (*Figura 3c*).

De los resultados obtenidos puede deducirse que la técnica de PCR-RFLP empleando las endonucleasas *MbolI*, *BsII* y *ApoI*, generó patrones de restricción con un menor número de bandas y, por tanto, más sencillos de interpretar que los obtenidos al utilizar la enzima *MseI*. Además, con la combinación de las tres enzimas no se detectaron variaciones intraespecíficas después de analizar 25 individuos de cada especie.

Los marcadores mitocondriales más utilizados para la diferenciación de especies animales han sido el gen que codifica para el citocromo b (Meyer y col., 1995; Wolf y col., 1999;

Partis y col., 2000; Verkaar y col., 2002; Kroska y col., 2003; Pascoal y col., 2004; Pfeiffer y col., 2004; Aida y col., 2005; Maede, 2006), el gen 12S ARNr (Sun y Lin, 2003; Girish y col., 2005; Saini y col., 2007), el 16S ARNr (Abdulmawjood y Bulte, 2001; Brzezinski, 2005; Kochzius y col., 2008) y la región D-loop (Murray y col., 1995; Krkoska y col., 2003; Kotowicz y col., 2007). De los genes nucleares, destacan el gen que codifica la α -actina (Hopwood y col., 1999; Rodríguez y col., 2003), el gen que codifica el factor liberador de la hormona de crecimiento (GnRH) (Meyer y col., 1995; Rehbein, 2005) y el gen 5S ARNr (Pinhal y col., 2008). A pesar de que estos marcadores genéticos han demostrado ser útiles en la técnica de PCR-RFLP aplicada a la identificación de especies, la selección de endonucleasas en regiones conservadas del gen diana se encuentra a menudo dificultada por la presencia de mutaciones puntuales en las secuencias de ADN de individuos de la misma especie, siendo necesario recurrir a un elevado número de enzimas para llevar a cabo la diferenciación de especies estrechamente relacionadas (Wolf y col., 1999). Como ya se ha señalado, los polimorfismos intraespecíficos detectados en este trabajo al analizar los individuos de ciervo y corzo afectaban a los sitios de reconocimiento de la enzima *MseI*, originándose dos perfiles de restricción diferentes en cada una de estas especies. Por el contrario, las enzimas *MbolI*, *BsI* y *ApoI* presentan sus dianas de restricción en zonas conservadas del gen 12S ARNr, permitiendo la identificación inequívoca de las seis especies objeto de estudio.

En este trabajo también se analizaron varios productos comerciales de caza mayor con el fin de evaluar la influencia de los tratamientos de procesado en la aplicabilidad de la técnica de PCR-RFLP descrita. Los productos comerciales consistían en muestras de carne cruda curada (cecinas) y conservas esterilizadas, tanto de ciervo como de corzo. Para el análisis por PCR-RFLP de los productos crudos curados, se amplificó el fragmento conservado de 712 pb del gen 12S ARNr a partir del ADN extraído de las muestras cárnicas. A continuación, los productos de PCR amplificados se digirieron con las endonucleasas seleccionadas (*MseI* y *MbolI*, *BsI* y *ApoI*) y los fragmentos resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. En un primer análisis de muestras comerciales, los resultados obtenidos revelaron que el origen de las muestras de cecina analizadas coincidía con la especie descrita en el etiquetado. Por el contrario, en un estudio posterior realizado con un mayor número de muestras se comprobó que el 20% de las cecinas de cérvidos analizadas eran de vaca, demostrando la utilidad de la técnica de PCR-RFLP en el análisis de autenticidad de carnes crudas curadas. Sin embargo, hay que señalar que en las conservas de ciervo y corzo, no fue posible la amplificación del fragmento de ADN conservado de 712 pb. El ADN se puede degradar por diversas causas, aunque la más frecuente es el empleo de tratamientos térmicos que lo fragmentan, limitando la eficacia de la reacción de amplificación. Así, cuanto mayor es la fragmentación del ADN de una muestra, menor es el número de copias intactas de un gen que se encuentran presentes y, por tanto, resulta más difícil su amplificación por PCR (Herman, 2001; Girish y col., 2004). En consecuencia, cuando se analizan muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos, es

necesario seleccionar regiones de ADN de menor tamaño para poder aplicar con éxito la técnica de PCR-RFLP. Una alternativa útil para la identificación de especies en estos productos es la técnica de PCR con cebadores especie-específicos diseñados para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (100-150 pb) (Matsunaga y col., 1999; Rodríguez y col., 2004).

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la técnica de PCR-RFLP desarrollada empleando como marcador el gen mitocondrial 12S ARN ribosómico constituye una herramienta sensible y fiable para la identificación específica de ciervo, gamo, corzo y su diferenciación de otras especies comerciales como vaca, oveja y cabra, tanto en carnes frescas como en productos curados. A diferencia de otras metodologías como la secuenciación de fragmentos amplificados por PCR (PCR-secuenciación) (Kocher y col., 1989; Brodmann y col., 2001; Colombo y col., 2004), la técnica de PCR-RFLP es sencilla, rápida, y no requiere el uso de instrumental complejo. Por ello, resulta muy apropiada para análisis rutinarios en programas de control de calidad de la industria cárnica permitiendo garantizar la autenticidad de los productos que se comercializan (Meyer y col., 1995; Wolf y col., 1999; Pascoal y col., 2004).

Desarrollo de una técnica de PCR-RFLP para la identificación de carnes procedentes de rebeco (*Rupicapra rupicapra*), cabra montés (*Capra pyrenaica*) y muflón (*Ovis ammon*)

Dentro de la familia de los bóvidos salvajes, la subfamilia *Caprinae* incluye especies relacionadas filogenéticamente pertenecientes a los géneros *Rupicapra*, *Capra* y *Ovis*. Las especies europeas de caza mayor incluidas en estos géneros son el rebeco, la cabra montés y el muflón. El objetivo planteado en este estudio ha sido la identificación específica de carnes procedentes de rebeco, muflón y cabra montés, y su diferenciación de otras especies domésticas como vaca, oveja, cabra y cerdo mediante una técnica de PCR-RFLP. Para lograr este objetivo, se utilizó el gen mitocondrial 12S ARNr para la identificación de carnes de rebeco, cabra montés, muflón/oveja, vaca, cabra y cerdo. Además, se seleccionó la región mitocondrial D-loop para llevar a cabo la diferenciación de carnes de muflón y oveja.

Identificación por PCR-RFLP de rebeco, cabra montés, muflón/oveja, vaca, cabra y cerdo empleando el gen mitocondrial 12S ARNr

Para la identificación de las especies de interés, se amplificó por PCR el fragmento común de 712 pb del gen 12S ARNr utilizando los cebadores conservados 12S-FW y 12S-REV (Fajardo y col., 2006). Los amplicones obtenidos en varios individuos de cada especie se purificaron y se secuenciaron para su posterior análisis. Las secuencias obtenidas aparecen registradas en la base de datos NCBI con los siguientes números de acceso: AM158314 (rebeco), AM158313 (cabra montés), AM158317 (muflón), AJ885201 (vaca), AJ885200 (oveja), AJ885199 (cabra doméstica) y AM158316 (cerdo).

A partir de las secuencias nucleotídicas del fragmento 12S ARNr se construyeron los correspondientes mapas de restricción y se seleccionaron las enzimas *MseI* y *ApoI* para llevar a cabo la diferenciación de las especies objeto de estudio mediante PCR-RFLP. En la *Figura 1* (pág. 84) aparece el alineamiento de las secuencias consenso obtenidas en el gen 12S ARNr de rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja, cabra doméstica y cerdo, así como la localización de los lugares de restricción de las enzimas elegidas. Es importante mencionar que las secuencias del gen 12S ARNr de muflón y oveja fueron 100% idénticas, no siendo posible la selección de enzimas en este marcador que pudieran discriminar estas dos especies ovinas.

La digestión de los productos de PCR con las endonucleasas *MseI* y *ApoI* (*Figura 2*, pág. 86) originó patrones de bandas especie-específicos, excepto en muflón (línea 3) y en oveja (línea 7). Debido a la mencionada homología de las secuencias del gen 12S ARNr, estas dos especies generaron un perfil electroforético común, aunque diferenciable de los patrones obtenidos en el resto de las especies analizadas. Conviene señalar que aunque las digestiones obtenidas con la enzima *MseI* originaron perfiles característicos de rebeco, cabra montés, muflón/oveja, vaca, cabra doméstica y cerdo (*Figura 2a*), los patrones de bandas de rebeco (línea 2) y cabra doméstica (línea 5) podrían confundirse, en las imágenes electroforéticas, debido a la proximidad en la longitud de sus fragmentos de restricción. Por esta razón se eligió otra endonucleasa, la *ApoI*, que permitió la diferenciación inequívoca de estas dos últimas especies (*Figura 2b*). Los fragmentos de ADN obtenidos en cada especie, tras el análisis electroforético de los productos de la digestión con las endonucleasas *MseI* y *ApoI*, coincidieron con los correspondientes mapas de restricción (*Tabla 2*, pág. 85). Se analizaron 25 individuos de cada especie y no se observaron variaciones intraespecíficas en los perfiles de restricción generados, confirmandose la reproducibilidad de la técnica de PCR-RFLP desarrollada.

Una de las ventajas de la técnica de PCR-RFLP es que permite diferenciar especies, aún cuando el número de polimorfismos existentes entre individuos filogenéticamente relacionados sea demasiado reducido como para detectarse mediante otras técnicas genéticas (Wolf y col., 1999; Girish y col., 2005). En el presente trabajo, a pesar de que las secuencias del fragmento de 712 pb del gen 12S ARNr de cabra montés y cabra doméstica difieren únicamente en 7 posiciones nucleotídicas, su discriminación por PCR-RFLP fue posible ya que uno de los polimorfismos afectaba a la diana de restricción de la enzima *MseI*, dando lugar a perfiles de restricción especie-específicos.

Como se ha indicado anteriormente, la aplicabilidad de la técnica de PCR-RFLP empleando el fragmento de 712 pb del gen 12S ARNr está limitada a la hora de analizar alimentos sometidos a tratamientos térmicos intensos u otros métodos de procesado donde el ADN se encuentre degradado. También hay que señalar que la técnica de PCR-RFLP descrita en este trabajo no resultaría apropiada para el análisis de productos cárnicos que contienen dos o más especies en su composición, como por ejemplo, salchichas, patés, productos cárnicos

picados, etc. Esto es debido a que los cebadores conservados amplificarían el ADN de todas las especies presentes en el alimento y, por tanto, los perfiles de restricción resultantes consistirían en una mezcla de patrones de bandas característicos de cada una de ellas, dificultando la interpretación de los resultados (Partis y col., 2000; Girish y col., 2005). Para el análisis de matrices complejas que contengan varias especies animales, o donde el ADN esté fragmentado por los tratamientos de procesado aplicados, es recomendable emplear la técnica de PCR que utiliza cebadores específicos diseñados para amplificar fragmentos de ADN de pequeño tamaño (Rodríguez y col., 2004; Arslan y col., 2006).

De los resultados obtenidos en este estudio puede concluirse que la técnica de PCR-RFLP desarrollada en el gen 12S ARNr permite la identificación inequívoca de carnes procedentes de rebeco, cabra montés y muflón/oveja, y su diferenciación de especies domésticas como vaca, cabra y cerdo.

Diferenciación por PCR-RFLP de muflón y oveja empleando la región mitocondrial D-loop

Debido a la imposibilidad de diferenciar el muflón y la oveja con el marcador genético 12S ARNr, se seleccionó la región polimórfica D-loop incluida en la región control del ADN mitocondrial para la discriminación de estas dos especies ovinas. La región control, en especial la zona D-loop, posee una elevada tasa de evolución debido a sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos, siendo la principal responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial (Sbisá y col., 1997).

El estudio informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de este marcador para diferentes especies animales, permitió el diseño de los cebadores DLOOP-FW y DLOOP-REV para la amplificación de una región D-loop conservada en rebeco, cabra montés, muflón, oveja, vaca, cabra doméstica y cerdo. Estos cebadores amplificaron fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 700 y 1000 pb dependiendo de la especie analizada, coincidiendo con las observaciones de algunos autores que indican que la región control es la responsable de la variación en la longitud del genoma mitocondrial de los vertebrados (Cozzi y col., 2004; Lai y col., 2006).

El análisis comparativo de las secuencias obtenidas con los cebadores DLOOP-FW y DLOOP-REV en varios individuos de cada especie, facilitó el diseño de los cebadores MSDLOOP-FW y MSDLOOP-REV que delimitaban un fragmento específico de 370 pb en muflón y oveja. Esta pareja de cebadores amplificó el fragmento esperado en las dos especies, sin producir señal de amplificación en rebeco, cabra montés, ciervo, gamo, corzo, vaca, cabra doméstica y cerdo (*Figura 3*, pág. 86).

Una vez comprobada la idoneidad de la amplificación del fragmento de 370 pb con los cebadores MSDLOOP-FW/MSDLOOP-REV, se purificaron y se secuenciaron los amplicones obtenidos a partir del ADN extraído de diez ejemplares de cada especie. Como puede

observarse en la *Figura 4* (pág. 87), la presencia de algunas mutaciones puntuales en el ADN originó 3 tipos diferentes de secuencias D-loop para muflón (números de acceso: AM261442, AM261443 y AM261444) y 10 para oveja (AM261445—AM261454). Tras el estudio detallado de los mapas de restricción obtenidos en dichas secuencias, se eligió la endonucleasa *MaeII* para llevar a cabo la diferenciación de muflón y oveja por PCR-RFLP.

El polimorfismo nucleotídico detectado en el fragmento D-loop dio lugar a la obtención de un único perfil de restricción con la endonucleasa *MaeII* para las muestras de oveja, claramente diferenciable de los tres patrones electroforéticos que se generaron con esta enzima en las muestras de muflón (*Figura 5*, pág. 88). El 73% de los muflones analizados originaron el perfil A, el 25% el B y solamente un individuo generó el perfil C. Los resultados obtenidos no variaron después del análisis de 36 individuos de cada especie, y se ajustaron a los patrones de bandas esperados según los mapas de restricción (*Tabla 3*, pág. 88).

Teniendo en cuenta la hipótesis que considera al muflón (*Ovis ammon*) como el ancestro que dio origen a la actual oveja doméstica (*Ovis aries*) (Hiendleder y col., 2002), la aplicabilidad de la técnica de PCR-RFLP para diferenciar estas dos especies puede verse condicionada por su elevada proximidad filogenética y, además, por las mutaciones puntuales que pueden ocurrir al azar en un determinado lugar de restricción, como ya han descrito algunos autores (Murray y col., 1995; Wolf y col., 1999). Por tanto, aunque la reproducibilidad en los patrones de bandas obtenidos en muflón y oveja es adecuada, sería conveniente realizar un análisis más exhaustivo incluyendo un mayor número de individuos.

En conclusión, las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas en este estudio empleando los marcadores genéticos mitocondriales 12S ARNr y D-loop son útiles para verificar la autenticidad de los productos cárnicos expuestos a la venta que contienen especies de caza mayor.

Diferenciación de carnes procedentes de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) mediante el análisis por PCR de la región mitocondrial D-loop y el gen nuclear *MC1R*

A pesar de que el jabalí y el cerdo doméstico pertenecen a la misma especie (*Sus scrofa*), tanto sus características productivas como los atributos de su carne son diferentes. En este estudio se ha abordado la diferenciación de carnes procedentes de jabalí europeo y cerdo doméstico mediante el análisis por PCR de dos marcadores genéticos: la región mitocondrial D-loop y el gen nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*).

Hay que señalar que el marcador mitocondrial 12S ARNr utilizado en trabajos previos (Fajardo y col., 2006, 2007) se descartó debido a que las secuencias de este gen obtenidas en jabalí y cerdo doméstico fueron 100% idénticas.

Análisis por PCR de la región mitocondrial D-loop

Para la diferenciación de jabalí y cerdo doméstico se eligió inicialmente la región mitocondrial D-loop, debido a que el alto grado de polimorfismo de este gen lo hace especialmente adecuado para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Sbisà y col., 1997).

En primer lugar, se alinearon y compararon las secuencias de la región D-loop disponibles en las bases de datos *Genbank/EMBL* de varias especies animales para delimitar una región que presentase una variabilidad inter e intraespecífica elevada y potencialmente óptima para abordar la diferenciación de las variedades salvaje y doméstica de *Sus scrofa* mediante PCR-RFLP. Tras el estudio del alineamiento, se diseñó una pareja de cebadores conservados (MITDLOOP-FW/MITDLOOP-REV) para la amplificación de un fragmento común de ADN en la región D-loop de aproximadamente 270 pb. La *Figura 1* (pág. 93) muestra la amplificación obtenida del producto de PCR esperado a partir del ADN extraído de varias muestras de jabalí y cerdo doméstico.

Como han señalado algunos autores (Murray y col., 1995; Bellis y col., 2003), el estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP_s) presentes en las secuencias de la región D-loop resulta muy útil para la identificación de especies por técnicas de PCR, dado que las mutaciones que se originan entre diferentes poblaciones animales y entre individuos de una misma especie son especialmente frecuentes en esta zona del genoma mitocondrial. Para disponer de información sobre el grado de variabilidad nucleotídica existente en el fragmento D-loop de 270 pb de jabalí y cerdo doméstico, se amplificó, purificó y secuenció este segmento de ADN en 15 individuos de cada subespecie de *Sus scrofa*. Como muestra la *Figura 2* (pág. 94), se observó un reducido número de polimorfismos intraespecíficos en la zona secuenciada, originándose 5 tipos de secuencias D-loop para jabalí (nº acceso: AM420335–AM420339) y 4 para cerdo doméstico (AM420331–AM420334). El examen posterior de las secuencias reveló la ausencia de posiciones nucleotídicas polimórficas diagnósticas y, consiguientemente, la imposibilidad de diferenciar entre *Sus s. scrofa* y *Sus s. domestica* mediante una técnica de PCR-RFLP. Estos resultados concuerdan con las observaciones planteadas en otros estudios (Wolf y col., 1999; Montiel-Sosa y col., 2000; Brodmann y col., 2001; Krkoska y col., 2003) que indican que el desarrollo de técnicas de PCR-RFLP para la diferenciación de carnes de jabalí y cerdo doméstico puede verse limitada debido a su elevada proximidad filogenética y, además, por las mutaciones intraespecíficas que pueden ocurrir al azar en una determinada diana de restricción. Del análisis de la bibliografía científica disponible se deduce la dificultad existente para la discriminación entre jabalí y cerdo doméstico mediante otras técnicas de PCR basadas en el marcador mitocondrial D-loop, como el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN (PCR-SSCP) (Rea y col., 1996).

Además de las dificultades y la controversia existentes en torno a la utilización de marcadores genéticos mitocondriales para la diferenciación de las subespecies salvaje y doméstica de *Sus scrofa* (Montiel-Sosa y col., 2000; Krkoska y col., 2003), hay que tener en cuenta que el hecho de que el ADN mitocondrial se herede estricta y exclusivamente por vía materna impide la identificación de aquellos individuos híbridos originados como resultado del cruce de jabalíes y cerdos domésticos (Kijas y Andersson, 2001; Krkoska y col., 2003). Teniendo en cuenta estas consideraciones, es necesario recurrir a otras técnicas y/o regiones polimórficas del ADN para llevar a cabo la diferenciación de estas dos subespecies.

Análisis por PCR-RFLP del gen nuclear MC1R

Debido a que el marcador mitocondrial D-loop no resultó útil para la diferenciación mediante PCR-RFLP de carnes procedentes de jabalí y cerdo doméstico, se seleccionó el marcador nuclear que codifica para el receptor 1 de la melanocortina (*MC1R*). El gen *MC1R* juega un papel clave en la pigmentación de los mamíferos y posee una naturaleza elevadamente polimórfica. Además, se ha descrito una clara asociación entre determinadas mutaciones en la secuencia de este gen y diferentes fenotipos relacionados con el color de la capa de ciertas especies, entre las que se incluyen cerdo (Kijas y col., 1998; Okumura y col., 2000), vaca (Klungland y col., 1995; Russo y col., 2007), oveja (Vage y col., 1999, 2003), caballo (Marklund y col., 1996; Royo y col., 2008) y pollo (Takeuchi y col., 1996; Kerje y col., 2003). Estas propiedades convierten al gen *MC1R* en un marcador idóneo para la identificación y diferenciación de características ligadas a la coloración dérmica de una determinada raza y/o especie animal (Carrión y col., 2003; Fernández y col., 2004).

En un estudio realizado por Kijas y col. (1998), la comparación de secuencias del gen *MC1R* procedentes de diferentes razas porcinas demostró la presencia de distintos tipos de alelos asociados con patrones de color exclusivos de las razas analizadas. En este sentido, el jabalí europeo posee un único alelo, designado como *MC1R/E⁺*, cuya presencia es necesaria para la expresión del fenotipo salvaje *E⁺* que da lugar a una coloración marrón de la capa de estos animales. Estos autores también apuntaron que la variante alélica *MC1R/E⁺* estaba ausente en la mayor parte de las razas de cerdo doméstico. Teniendo en cuenta estas premisas, el gen *MC1R* se consideró como una opción potencialmente adecuada para acometer la discriminación de carnes procedentes de jabalí europeo y cerdo doméstico. Por otro lado, al tratarse de un gen nuclear, el marcador *MC1R* podría conferir la ventaja adicional de permitir diferenciar los jabalíes de origen puro de los híbridos, originados como consecuencia de cruzamientos intencionados o accidentales con cerdos domésticos.

En el presente trabajo, a partir del alineamiento de las secuencias del gen *MC1R* de mamíferos disponibles en la base de datos *NCBI*, se diseñaron los cebadores *MC1R-FW* y *MC1R-REV* para la amplificación de un fragmento de 795 pb específico de *Sus scrofa*. Esta pareja de cebadores especie-específicos amplificó el fragmento esperado a partir del ADN

extraído de tejido muscular de jabalí y cerdo doméstico, sin producir señal de amplificación en otras especies como ciervo, gamo, corzo, rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja y cabra (*Figura 3*, pág. 94).

A continuación, se obtuvieron y se analizaron los mapas de restricción del fragmento de 795 pb correspondientes a varias secuencias del gen *MC1R* de *Sus scrofa* publicadas en las bases de datos. La detección de diversos polimorfismos nucleotídicos en las secuencias *MC1R* de jabalí y cerdo doméstico, permitió elegir las endonucleasas *BspHI* y *BstUI* como candidatas para llevar a cabo la diferenciación (*Figura 4*, pág. 95). Los patrones de bandas de ADN esperados atendiendo a los mapas de restricción obtenidos con cada una de las enzimas seleccionadas originaron un único perfil para jabalí y dos para el cerdo doméstico (*Tabla 2*, pág. 96). Estos datos están en consonancia con los resultados de Kijas y col. (1998), que demuestran que el polimorfismo intraespecífico presente en el gen *MC1R* de *Sus scrofa* determina que el jabalí y el cerdo doméstico posean alelos distintos en el locus *MC1R/E*.

En este trabajo, se amplificó el ADN de muestras de carne procedentes de 45 ejemplares de jabalí y de cerdo doméstico con los cebadores específicos *MC1R-FW/MC1R-REV* para, posteriormente, proceder al análisis de los perfiles de restricción con las enzimas, *BspHI* y *BstUI*. De acuerdo con los resultados obtenidos (*Figura 5*, pág. 96), en la mayoría de las muestras de jabalíes analizadas (89%) se observó el perfil de restricción esperado (Wb, líneas 2 y 3), mientras que en el 11% restante se produjo un perfil diferente (WbH, líneas 8 y 9). Respecto al cerdo doméstico, el 73% de las muestras se adscribieron a los dos perfiles esperados, tipo A (DsA, líneas 4 y 5) o tipo B (DsB, líneas 6 y 7), y el 27% restante originó un patrón diferente (DsH, líneas 10 y 11). En definitiva, la técnica de PCR-RFLP desarrollada en el gen *MC1R* reveló dos perfiles de restricción característicos de jabalí (denominados como Wb y WbH), claramente diferenciables de los tres perfiles obtenidos en el cerdo doméstico (DsA, DsB y DsH).

El examen visual de los fragmentos de restricción generados en las muestras de jabalí (Wb) y de cerdo doméstico tipo A (DsA), puede indicar que el perfil minoritario encontrado en algunas muestras de jabalí (WbH) podría corresponderse a individuos híbridos resultado del cruce de jabalí y cerdo doméstico. Los jabalíes híbridos portarían información genética de ambos progenitores, dando lugar a un perfil heterocigoto diferente del obtenido en aquellos jabalíes puros cuya estirpe carece de genes procedentes de la variedad doméstica. Así, no sería desacertado considerar como jabalíes híbridos a las muestras asignadas en este trabajo al perfil WbH, dado que los cerdos pueden criarse en sistemas de producción de tipo extensivo donde comparten hábitat con los jabalíes. Además, cabe destacar que el cruzamiento intencionado de jabalíes con hembras de cerdo doméstico es una práctica que se realiza con cierta frecuencia en los sistemas de producción porcina, ya que en la camada resultante de mestizos predominan las características fenotípicas del jabalí puro, cuya carne tiene menos niveles de grasa y colesterol

que la de los híbridos. La comercialización de estas crías como jabalíes puros constituye un fraude económico (Wolf y col., 1999; Naya y col., 2003).

Siguiendo la misma hipótesis que en el caso de la carne de jabalí, el perfil minoritario (27%) obtenido en las muestras de cerdo designadas como DsH, compartiría bandas de ADN de los perfiles tipo A y B, pudiendo tratarse del cruce de diferentes razas de cerdo doméstico.

Para confirmar las observaciones anteriores, se purificaron y se secuenciaron varios productos de PCR de 795 pb del gen *MC1R* correspondientes a los cinco perfiles de restricción obtenidos tras el análisis por PCR-RFLP (Wb, WbH, DsA, DsB y DsH). Las secuencias resultantes se registraron en la base de datos *NCBI* con los siguientes números de acceso: AM492523 (Wb); AM492525 (WbH); AM492526 (DsA); AM492528 (DsB) y AM492530 (DsH). El estudio de los picos cromatográficos generados tras la secuenciación de las muestras demostró que existían tres posiciones polimórficas diagnósticas (373, 494 y 730 pb) que afectaban a las dianas de restricción de las enzimas *BspHI* o *BstUI*, dando lugar a perfiles de bandas característicos (*Tabla 3*, pág. 97). Concretamente, el perfil de las muestras de jabalí híbrido (WbH) parece ser resultado del dimorfismo presente en la posición nucleotídica 373 (G/A), que hace que la enzima *BspHI* corte únicamente el alelo dimórfico que presenta el lugar de restricción de la enzima (originando fragmentos de 539 y 256 pb), mientras que en el otro alelo el fragmento original permanece sin digerir (795 pb). En el caso de las muestras de cerdo doméstico adscritas al perfil minoritario tipo DsH, se detectaron tres dimorfismos en su secuencia (G/A, C/T y G/A, situados en las posiciones nucleotídicas 373, 494 y 730, respectivamente), dando lugar al patrón de bandas heterocigoto indicado en la *Figura 5* para estos individuos (pág. 96). De acuerdo a esta información, las muestras de carne de cerdo con perfil DsH compartirían fragmentos de ADN de los perfiles tipo DsA y DsB como consecuencia del cruce de diferentes razas porcinas (*Figura 5*, pág. 96). Los resultados obtenidos demostraron que el gen *MC1R* puede constituir un marcador adecuado para la diferenciación de carnes de jabalí y cerdo doméstico, y también puede resultar útil para la discriminación de muestras de carne de jabalí híbrido susceptibles de ser comercializadas como jabalí puro.

De los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, puede concluirse que el análisis de la región mitocondrial D-loop no permitió el desarrollo de una técnica de PCR-RFLP para la identificación de carnes procedentes de jabalí europeo y cerdo doméstico. Sin embargo, mediante la amplificación específica de un fragmento del gen nuclear *MC1R* en la especie *Sus scrofa*, seguida de la digestión enzimática de los amplicones con las endonucleasas *BspHI* y *BstUI*, sí se consiguió la discriminación de carnes de las subespecies *Sus s. scrofa* y *Sus s. domestica*, lo que permite disponer de un procedimiento rápido y eficaz para detectar posibles fraudes de sustitución en la industria cárnica.

Aplicación de una técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip* para la identificación de carnes procedentes de especies de caza mayor en el gen mitocondrial 12S ARNr

La tecnología de microfluidos utilizada en la fabricación de los “laboratorios en chip” (*lab-on-a-chip*) permite la miniaturización, integración y automatización de los sistemas de análisis. Uno de los procedimientos de esta nueva tecnología que está encontrando una amplia aplicación dentro del área de la identificación de especies es la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip* (Dooley y col., 2005a), que adapta la metodología convencional de electroforesis capilar a un formato de chip miniaturizado de un sólo uso (*LabChip*). En este trabajo se ha utilizado el novedoso soporte *LabChip* para integrar y mejorar los resultados obtenidos en la técnica de PCR-RFLP convencional descrita en publicaciones anteriores (Fajardo y col., 2006, 2007) para la identificación de carnes procedentes de especies de caza mayor.

Como ya se ha descrito, el procedimiento se basa en la amplificación por PCR de un fragmento conservado de ADN de aproximadamente 720 pb del gen 12S ARNr en todas las especies de interés, seguida de una digestión enzimática de los amplicones con la enzima *MseI* o con la combinación de las enzimas *MbolI*, *BstI* y *ApoI*, para obtener perfiles de restricción especie-específicos (Fajardo y col., 2006, 2007). En la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip*, la separación electroforética de los fragmentos de ADN tiene lugar en un soporte sólido (*chip*) que evita la elaboración del gel de agarosa y su tratamiento con bromuro de etidio. La electroforesis se realiza en un equipo que permite el procesado de datos en un *software* que muestra la imagen de un gel clásico y un electroferograma con las diferentes bandas y, además, calcula la concentración de cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos.

En este trabajo, tras la digestión con las endonucleasas elegidas (*MseI* y *MbolI*, *BstI* y *ApoI*) de los productos de PCR obtenidos en cada especie con los cebadores conservados 12S-FW y 12S-REV (Fajardo y col., 2006), se obtuvieron patrones de bandas de ADN característicos que se analizaron y visualizaron utilizando el soporte *LabChip DNA 1000* y el programa informático *software Experto 2100* para el Bioanalizador *Agilent 2100*. Los chips empleados permiten una adecuada resolución y visualización de los fragmentos de ADN comprendidos entre aproximadamente 25 y 1000 pb, que son detectados mediante fluorescencia inducida por láser (Nachamkin y col., 2001; Dooley y col., 2005a). El tamaño de los fragmentos se determina mediante la comparación con un marcador de peso molecular.

La *Figura 1* (pág. 102) representa una imagen digitalizada de un gel de agarosa elaborada por el *software* del Bioanalizador *Agilent 2100*, donde se observan los patrones de bandas de ADN obtenidos en la técnica de PCR-RFLP al utilizar la enzima *MseI*. Como puede apreciarse, los perfiles de restricción generados con esta endonucleasa permitieron la diferenciación, en un sólo paso, de ciervo, gamo, corzo, rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja, cabra y cerdo, de acuerdo con los resultados alcanzados en estudios anteriores (Fajardo y col., 2006, 2007). En consonancia con estos trabajos, al emplear la técnica de PCR-RFLP *lab-*

on-a-chip se genera más de un patrón electroforético característico en el caso del ciervo (líneas 2 y 3) y corzo (líneas 5 y 6), debido a la presencia de mutaciones puntuales en las secuencias del gen 12S ARNr de estas especies que afectan a los lugares de corte de la enzima *MseI*.

Para evitar la variabilidad intraespecífica detectada en ciervo y corzo con la enzima *MseI*, se empleó una combinación de las enzimas *MbolI*, *BsII* y *ApoI* en reacciones de restricción independientes (Fajardo y col., 2006). Como puede observarse en la *Figura 2* (pág. 104), los perfiles de restricción obtenidos tras la digestión con las endonucleasas *MbolI* (2a), *BsII* (2b) y *ApoI* (2c), permitieron la diferenciación de las diez especies de caza mayor y domésticas objeto de estudio. A diferencia de lo que ocurría con la enzima *MseI*, las enzimas *MbolI*, *BsII* y *ApoI*, poseen sus lugares de restricción en zonas conservadas del gen 12S ARNr. Por ello, no se detectaron variaciones intraespecíficas tras las digestiones enzimáticas, obteniéndose un perfil de bandas característico de cada especie. Estos resultados mostraron una clara correspondencia con los patrones de bandas generados en la técnica de PCR-RFLP convencional desarrollada para la diferenciación de cérvidos (Fajardo y col., 2006). No obstante, la adaptación de la técnica al soporte *lab-on-a-chip* añade la ventaja de poder diferenciar conjuntamente todas las especies de cérvidos, bóvidos salvajes y especies domésticas analizadas al utilizar la combinación de las enzimas *MbolI*, *BsII* y *ApoI*.

La *Tabla 1* (pág. 103) indica el tamaño medio de los fragmentos de ADN obtenidos después del análisis de cinco individuos de cada especie. Algunos autores sugieren que el Bioanalizador *Agilent 2100* puede presentar dificultades a la hora de detectar fragmentos de ADN inferiores a 35 pb, probablemente debido a que el límite inferior en el tamaño de bandas que los *chips DNA 1000* pueden poner de manifiesto está próximo a este valor, o a que la intensidad de fluorescencia emitida no es suficiente como para poder detectar fragmentos muy pequeños (Nachamkin y col., 2001; Dooley y col., 2005a). En cualquier caso, el nuevo formato *lab-on-a-chip* mejora considerablemente la resolución de los perfiles de restricción, permitiendo la visualización de algunas bandas de ADN de pequeño tamaño (35-50 pb) que en el caso de algunas digestiones, como las de la enzima *MseI*, no se detectaban por la técnica de PCR-RFLP convencional (*Figura 1*, pág. 102).

Conviene señalar que la medida de los fragmentos de ADN que calcula el *software* Experto 2100 presenta pequeñas diferencias con respecto a los tamaños descritos en la técnica de PCR-RFLP convencional (Fajardo y col., 2006, 2007). Esta observación coincide con los resultados de otros trabajos (Dooley y col., 2005a), que también señalan una pequeña variación (alrededor del 5%) entre el tamaño de los fragmentos de ADN calculados según los mapas de restricción enzimática, y los observados tras el análisis con el Bioanalizador *Agilent 2100*. En el presente trabajo, la mayor diferencia observada entre los tamaños esperados de los fragmentos de ADN y los obtenidos experimentalmente fue del 8%. No obstante, es importante señalar que, a pesar de estas diferencias, el tamaño y los patrones de bandas obtenidos al analizar cinco

individuos de cada especie se mantuvieron constantes, permitiendo la identificación específica de todas ellas.

El análisis de los perfiles de restricción de las muestras seleccionadas mediante el empleo del Bioanalizador *Agilent* 2100 permite la interpretación visual directa e inequívoca de los resultados obtenidos sin la necesidad de emplear aparatos específicos para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa ni transiluminadores de luz ultravioleta (Panaro y col., 2000). Con los *chips DNA* 1000 se pueden obtener los resultados de 12 muestras en 1 hora, incluyendo el examen posterior de los patrones de bandas obtenidos. El reducido tamaño de los dispositivos de *LabChip* implica un menor consumo de reactivos y de muestras, y existe un menor riesgo de contaminación a cuando el análisis se realiza en sucesivos pasos. Asimismo, la manipulación de los *chips* es más segura, ya que se elimina el uso de carcinógenos potenciales como el bromuro de etidio utilizado para teñir los geles de agarosa (Dooley 2005a, b).

De los resultados obtenidos en este trabajo puede concluirse que la técnica de PCR-RFLP *lab-on-a-chip* ofrece ventajas significativas en términos de rapidez, especificidad, grado de automatización y bajo coste, con respecto a los métodos de PCR-RFLP convencionales.

IV.1.2. TÉCNICA DE PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS

Identificación de carnes procedentes de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) mediante una técnica de PCR con cebadores específicos diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr

En este trabajo se ha desarrollado un ensayo de PCR con cebadores específicos para la identificación de carnes de ciervo, gamo y corzo basado en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN del gen mitocondrial 12S ARNr.

La identificación de especies animales mediante técnicas de PCR depende, en gran medida, de la idoneidad de los cebadores empleados en las reacciones de amplificación. Para abordar el diseño de cebadores específicos, con frecuencia es necesario amplificar y secuenciar regiones comunes a varias especies empleando cebadores universales, con el fin de localizar diferencias en las secuencias que faciliten el posterior diseño de los cebadores especie-específicos (Herman, 2001; Di Pinto y col., 2005). El marcador mitocondrial 12S ARNr propuesto en este estudio presenta zonas conservadas con regiones variables que facilitan la identificación de diferencias nucleotídicas interespecíficas (Cronin, 1992).

En este trabajo, se amplificó por PCR un fragmento común del gen 12S ARNr (~720 pb) a partir de las muestras de carne de ciervo, gamo, corzo, rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja, cabra y cerdo (*Figura 1*, pág. 109). A continuación, se purificaron y se secuenciaron los amplicones obtenidos en al menos once ejemplares de ciervo, gamo y corzo con el fin de obtener la información nucleotídica necesaria para el diseño de cebadores específicos de

cérvidos. Para garantizar un grado de especificidad óptimo en el diseño de los cebadores, se incluyeron en el estudio las secuencias del gen 12S ARNr de otras especies de caza mayor y domésticas como rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja, cabra y cerdo (Fajardo y col., 2006, 2007).

La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas de las especies citadas, permitió el diseño de tres cebadores directos específicos de ciervo (12SCE-FW), gamo (12SDD-FW) y corzo (12SCC-FW). Estos cebadores se diseñaron en una región que incluía suficientes diferencias específicas de especie para poder llevar a cabo la identificación. Asimismo, se diseñó el cebador inverso 12SCERV-REV, en una zona nucleotídica común a las tres especies de cérvidos. Como muestra la *Figura 2* (pág. 110), para facilitar el diseño se emplearon en el alineamiento las secuencias consenso de ciervo y corzo, ya que la presencia de algunos polimorfismos nucleotídicos originó más de un tipo de secuencia en estas dos especies (Fajardo y col., 2006). No obstante, estas mutaciones puntuales no afectaban a la zona de hibridación de los cebadores en sus correspondientes secuencias diana.

El empleo de las parejas de cebadores 12SCE-FW/12SCERV-REV, 12SDD-FW/12SCERV-REV y 12SCC-FW/12SCERV-REV en una técnica de PCR, permitió la amplificación de fragmentos de ADN específicos de ciervo (175 pb), gamo (169 pb) y corzo (175 pb) (*Figura 3*, pág. 111). El tamaño de los amplicones obtenidos en cada especie coincidió con el esperado según el estudio de las secuencias del gen 12S ARNr. Además, se obtuvieron resultados satisfactorios en las amplificaciones tras analizar carnes procedentes de 25 individuos de ciervo, gamo y corzo. Como se observa en la *Figura 3* (pág. 111), las tres parejas de cebadores demostraron su especificidad frente a la correspondiente especie diana, no originando bandas de amplificación en las especies heterólogas de cérvidos, ni en otras como rebeco, muflón, cabra montés, vaca, oveja, cabra y cerdo. Tampoco se obtuvieron productos de PCR inespecíficos al analizar los ADNs de otras especies como conejo, pato, oca, pollo, pavo y caballo (resultados no mostrados).

Además de la especificidad de los cebadores, otro factor crucial a tener en cuenta en la identificación de especies por técnicas de PCR es la fragmentación que puede sufrir el ADN debido a las tecnologías de transformación aplicadas a algunos productos cárnicos. En aquellas muestras sometidas a tratamientos de procesado intensos, la amplificación por PCR puede fracasar, sobre todo cuando los cebadores delimitan fragmentos de ADN de elevado peso molecular (Matsunaga y col., 1999; Frezza y col., 2003). Por ello, cuando se parte de muestras cárnicas donde el nivel de degradación del ADN puede ser elevado, es preferible dirigir la amplificación hacia fragmentos de ADN de pequeño tamaño (Hird y col., 2003; Rodríguez y col., 2004; Arslan y col., 2006).

Una vez demostrada la correcta amplificación del ADN de las muestras cárnicas crudas, se determinó la aplicabilidad de la técnica de PCR frente a carnes de ciervo, gamo y corzo

sometidas a tratamientos experimentales de pasteurización (72 °C, 30 minutos) y esterilización (121 °C, 20 minutos). Como se observa en la *Figura 4* (pág. 111), el ADN extraído a partir de las muestras tratadas térmicamente mostró un patrón típico de degradación, mientras que en las muestras crudas se obtuvieron ADNs íntegros y de un peso molecular elevado. No obstante, los resultados alcanzados pusieron de manifiesto que la técnica de PCR descrita amplificaba por igual los fragmentos de ADN esperados en las muestras crudas, pasteurizadas y esterilizadas (*Figura 5*, pág. 112).

En este estudio también se analizaron productos cárnicos comerciales de cérvidos (cecinas, embutidos y conservas). Como muestra la *Figura 6* (pág. 112), con la pareja de cebadores de ciervo (12SCE-FW y 12SCERV-REV) se amplificó satisfactoriamente el fragmento esperado de 175 pb, tanto en los productos cárnicos curados (líneas 2 y 5) como en las conservas (líneas 6 y 7). Asimismo, los cebadores específicos de gamo y corzo amplificaron eficazmente los ADNs procedentes de los productos comerciales de estas especies (resultados no mostrados).

Además, se determinó el límite de detección de la técnica de PCR con cebadores específicos para detectar la presencia de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas elaboradas en una matriz de cerdo que contenía distintos porcentajes de la especie diana (0,1, 1, 5, 10 y 25%). El límite de detección conseguido fue del 0,1% en las tres baterías de mezclas cárnicas analizadas, tanto crudas como tratadas térmicamente (resultados no mostrados). Estos resultados demuestran que la técnica de PCR desarrollada es capaz de detectar bajos porcentajes de sustitución de la especie diana (0,1%), incluso en aquellas muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos.

Un problema que puede afectar a los protocolos de PCR deriva de posibles fallos en la amplificación del ADN debido a la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras. El fenómeno de inhibición puede disminuir, o incluso impedir por completo la amplificación por PCR, dando lugar a falsos resultados negativos (Wilson, 1997). En este sentido, el Comité Europeo de Estandarización, en colaboración con la ISO (Organización Internacional para la Estandarización), ha propuesto unas pautas generales para los ensayos de PCR que incluyen el requerimiento de utilizar un control interno en cada reacción de PCR que evite una mala interpretación de aquellos resultados de amplificación negativa que puedan deberse a fenómenos de inhibición (Lund y Mandsen, 2006). Teniendo en cuenta estas recomendaciones, todas las muestras analizadas con los cebadores específicos de cérvidos se examinaron, simultáneamente y en paralelo, con una pareja de cebadores conservados (12SEND-FW (5'-ACCGCCCGTCACCCTC-3') y 12SEND-REV (5'-TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGACTT-5')) que amplificaba un fragmento del gen 12S de ~ 100 pb común a varias especies de mamíferos (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos demuestran que, aunque el rendimiento e integridad de los ácidos nucleicos presentes en las matrices cárnicas pueda verse afectado por el procesamiento térmico aplicado, la técnica de PCR empleando cebadores específicos es capaz de amplificar el ADN diana incluso en productos sometidos a tratamientos térmicos de esterilización (Di Pinto y col., 2005; Arslan y col., 2006). Por lo tanto, esta técnica podría resultar más adecuada que la técnica de PCR-RFLP descrita en trabajos anteriores (Fajardo y col., 2006, 2007) para la identificación de especies animales en productos cárnicos procesados.

La utilización de técnicas de PCR para la autenticación de productos cárnicos se ha aplicado principalmente a la identificación de especies domésticas como vaca, oveja, cabra, cerdo, pavo o pollo (Herman y col., 2001; Colombo y col., 2002; Hird y col., 2003; Girish y col., 2004; Rodríguez y col., 2004; Koppel y col., 2008). Sin embargo, son muy escasos los trabajos publicados sobre autenticación de carnes de caza por técnicas de PCR. De la bibliografía consultada se desprende que la mayoría de ellos están basados en el empleo de genes mitocondriales para el desarrollo de técnicas de PCR-RFLP (Matsunaga y col., 1998; Wolf y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Verkaar y col., 2002; Fajardo y col., 2006). Como ya se ha señalado, la aplicabilidad de la técnica de PCR-RFLP es cuestionable cuando se analizan alimentos donde el ADN pueda estar degradado (Fajardo y col., 2006). Además, la técnica de PCR-RFLP puede resultar inadecuada para la identificación de productos cárnicos que contienen dos o más especies en su composición, debido a que la coexistencia de patrones de restricción característicos de cada una de ellas dificultaría la interpretación de los resultados obtenidos (Girish y col., 2005). Considerando todos estos aspectos, la técnica de PCR que utiliza cebadores específicos para la amplificación de fragmentos pequeños de ADN resulta especialmente útil en la autenticación de productos cárnicos, sobre todo si se han sometido a tratamientos térmicos intensos como las conservas o en aquéllos elaborados con más de una especie animal (Arslan y col., 2006).

En resumen, la técnica de PCR con cebadores especie-específicos comparada con otras técnicas como la PCR-RFLP (Cronin y col., 1992; Pfeiffer y col., 2004; Verkaar y col., 2002), la PCR-secuenciación (Brodmann y col., 2001; Colombo y col., 2004) o RAPD (Koh y col., 1998; Arslan y col., 2005; Rastogi y col., 2007), presenta las ventajas de ser rápida y eficaz, sin requerir otros procedimientos complementarios como la secuenciación o la restricción enzimática de los amplicones.

Utilización de una técnica de PCR para la detección específica de rebeco (*Rupicapra rupicapra*), cabra montés (*Capra pyrenaica*) y muflón (*Ovis ammon*) empleando la región mitocondrial D-loop

En este estudio se ha abordado la identificación por PCR de carnes de tres especies de caza mayor pertenecientes a la familia *Caprinae*: rebeco, cabra montés y muflón. La técnica emplea cebadores específicos de cápridos diseñados en la región mitocondrial D-loop, dado que

es la zona del genoma mitocondrial que presenta una mayor variabilidad nucleotídica (Sbisà y col., 1997). Además de la importancia de la diferenciación de especies animales para autenticar productos, la identificación de especies protegidas como la cabra montés, adquiere una especial relevancia para garantizar la conservación y mantenimiento de la fauna silvestre en peligro de extinción (Colombo y col., 2004).

En este trabajo, en primer lugar, se amplificó una zona conservada de la región mitocondrial D-loop de un tamaño comprendido entre 700 y 1000 pb en rebeco, cabra montés, muflón, ciervo, gamo, corzo, vaca, oveja, cabra y cerdo empleando los cebadores conservados DLOOP-FW y DLOOP-REV (Fajardo y col., 2007). La variabilidad observada en el tamaño de las amplificaciones dependiendo de la especie analizada (resultados no mostrados), concuerda con los resultados de algunos trabajos que indican que la región D-loop es la principal responsable de la variación en la longitud del genoma mitocondrial de los vertebrados (Cozzi y col., 2004; Lai y col., 2006).

Para la identificación por PCR de una secuencia diana se pueden emplear cebadores que amplifiquen fragmentos de ADN específicos de especie, siempre y cuando la zona seleccionada para la hibridación de los cebadores presente suficientes diferencias nucleotídicas interespecíficas (Kusama y col., 2004; Kesmen y col., 2007). Para llevar a cabo el diseño de los cebadores específicos de las especies de cápridos mencionadas, se purificaron y secuenciaron los amplicones D-loop obtenidos con los cebadores DLOOP-FW y DLOOP-REV de varios individuos de rebeco (AM279274, AM279275), cabra montés (AM279276, AM279277, AM279278), muflón (AM279279, AM279280), oveja (AM279282, AM279283, AM279284, AM279285) y cabra doméstica (AM279286, AM282549). Además de estas especies filogenéticamente próximas, se incluyeron en el estudio las secuencias D-loop obtenidas en otras especies de caza mayor y domésticas tales como ciervo (AM279271), gamo (AM279272), corzo (AM279273), vaca (AM279287) y cerdo (AM279281).

La *Figura 1* (pág. 118) muestra el alineamiento múltiple de las secuencias D-loop obtenidas en rebeco, cabra montés, muflón, oveja y cabra doméstica. Como puede observarse, existen numerosos polimorfismos a lo largo de todas las secuencias, así como variaciones significativas en la longitud del fragmento D-loop amplificado en los individuos de rebeco y cabra montés. Esta variabilidad intra e interespecífica originó dos tipos de secuencia D-loop para rebeco y tres para cabra montés. La información nucleotídica del alineamiento permitió el diseño de dos parejas de cebadores, RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV y PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV, de secuencia complementaria a regiones D-loop especie-específicas de rebeco y cabra montés, respectivamente.

Por otra parte, hay que señalar que en el caso del muflón también se obtuvieron varios tipos de secuencias D-loop como consecuencia de las mutaciones puntuales observadas en los diferentes individuos secuenciados (*Figura 1*, pág. 118). Debe, no obstante, precisarse que

debido a la elevada homología existente entre las secuencias D-loop de muflón y oveja se diseñaron los cebadores OADLOOP-FW/OADLOOP-REV para la amplificación de una región común a ambas especies. La dificultad para diferenciar estas dos especies tan filogenéticamente próximas concuerda con los resultados descritos por otros autores (Hiendleder y col., 1998) que respaldan la teoría que afirma que la oveja doméstica (*Ovis aries*) descende del muflón (*Ovis ammon*).

Como se aprecia en la *Figura 2* (pág. 119), los cebadores RPDLOOP-FW/RPDLOOP-REV amplificaron un fragmento específico de 178 pb en las muestras de rebeco, sin producir amplificación a partir de los ADNs de muflón, cabra montés, ciervo, gamo, corzo, vaca, oveja, cabra y cerdo (*Figura 2a*). Asimismo, los cebadores específicos de cabra montés, PIDLOOP-FW/PIDLOOP-REV, amplificaron un fragmento de 88 pb, sólo en esta especie animal (*Figura 2b*). Por último, la pareja de cebadores OADLOOP-FW/OADLOOP-REV amplificó el fragmento esperado de 155 pb específico de muflón y oveja (*Figura 2c*). El tamaño de los productos de PCR obtenidos con cada una de las tres parejas de cebadores coincidió con el esperado según el análisis de las secuencias D-loop. Asimismo, cabe destacar la consistencia y reproducibilidad de los ensayos tras analizar 15 individuos de cada especie objeto de estudio con sus respectivos cebadores específicos.

Como ya se ha comentado, el empleo de un control endógeno de amplificación es un factor muy importante en las técnicas de PCR. Por ello, y de forma análoga al trabajo anterior, la pareja de cebadores conservados (ENDLOOP-FW/DLOOPREV) que delimitaba un fragmento D-loop de ~270 pb común a varias especies de mamíferos se utilizó simultáneamente y en paralelo a los cebadores *caprinae*-específicos en todas las muestras analizadas. Los resultados obtenidos (*Figura 3*, pág. 119), mostraron una amplificación adecuada del segmento conservado de ADN en todas las especies seleccionadas, confirmando la utilidad de los cebadores ENDLOOP-FW/DLOOPREV como control positivo de amplificación.

En este estudio también se evaluó la aplicabilidad de la técnica de PCR descrita para analizar carnes de rebeco, cabra montés y muflón sometidas a tratamientos experimentales de pasteurización (72 °C, 30 minutos) y esterilización (121 °C, 20 minutos). A pesar de que los ADN extraídos a partir de las muestras tratadas térmicamente mostraban una clara fragmentación (*Figura 4*, pág. 120), todas las amplificaciones fueron satisfactorias y reproducibles (*Figura 5*, pág. 120).

Además, se determinó el límite de detección de la técnica de PCR con cebadores específicos para detectar la presencia de rebeco, cabra montés y muflón en mezclas cárnicas elaboradas en una matriz de cerdo que contenía distintos porcentajes de la especie diana (0,1, 1, 5, 10 y 25%). El límite de detección conseguido fue del 0,1% en las tres baterías de mezclas cárnicas analizadas, tanto crudas (*Figura 6*, pág. 121) como tratadas térmicamente (resultados no mostrados). Estos resultados demuestran que la técnica de PCR desarrollada es capaz de

detectar bajos porcentajes de sustitución de la especie diana (0,1%), incluso en aquellas muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos.

Puede concluirse que la técnica de PCR con cebadores *caprinae*-específicos diseñados en la región D-loop es un método sencillo en el que la interpretación de los resultados se puede realizar visualmente, sin la necesidad de emplear instrumentos complejos. Asimismo, sus características de rapidez, elevada sensibilidad y bajo coste (Herman, 2001; Kesmen y col., 2007), lo convierten en un procedimiento complementario a otras técnicas genéticas de identificación de especies como la PCR-secuenciación, PCR-RFLP, PCR-SSCP o hibridación del ADN (Buntjer y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Sáez y col., 2004).

IV.1.3. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

Desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de ADN de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) en mezclas cárnicas

Las técnicas de PCR convencionales que se desarrollan en varios pasos desde la amplificación del material genético hasta el análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un sólo tubo. Estos avances se basan en el uso de equipos de PCR con detección espectrofluorimétrica con los que es posible realizar un seguimiento cuantitativo en tiempo real del proceso de amplificación del ADN. Cuanto mayor sea el número de copias inicial del ácido nucleico diana, antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. La principal ventaja de esta metodología es que proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de las especies de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Brodmann y Moor, 2003; Frezza y col., 2003).

La detección por PCR en tiempo real de los productos amplificados puede realizarse recurriendo a varios sistemas. Entre ellos destacan los basados en sondas TaqMan[®], que hibridan en regiones específicas del ADN diana, y los que emplean el agente fluorescente inespecífico SYBR[®] Green. El SYBR[®] Green es un fluorocromo que se intercala entre las hebras de la doble hélice de ADN, independientemente de su secuencia de nucleótidos. Cuando este compuesto forma parte de la reacción de amplificación, sólo se detecta si está unido al ADN bicatenario. Por ello, si el producto de amplificación es específico, el aumento en la fluorescencia es proporcional al número de copias presentes inicialmente en la muestra (Sawyer y col., 2003). No obstante, como el SYBR[®] Green se une a cualquier molécula de ADN, las amplificaciones inespecíficas o la formación de dímeros de cebadores pueden originar errores significativos. El análisis de la curva de desnaturalización térmica (curva de *melting*) una vez finalizado los ciclos de amplificación, permite identificar el producto de PCR que ha sido detectado y confirmar su especificidad (López-Andreo y col., 2006).

Independientemente del sistema empleado, el seguimiento de la emisión de fluorescencia al final de cada ciclo de amplificación permite identificar el ciclo umbral (C_t), que es aquel a partir del cual la relación entre la fluorescencia emitida y el número de ciclos es exponencial. Mediante la elaboración de curvas estándar apropiadas se puede establecer una relación lineal entre el C_t de una muestra y el número inicial de copias de ADN diana presentes en la misma (Laube y col., 2007).

En este trabajo de investigación se planteó el desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real utilizando el agente intercalador fluorescente SYBR[®] Green para la detección y cuantificación de ADN de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) en mezclas cárnicas crudas y tratadas térmicamente. El procedimiento de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el sistema de detección de secuencias (SDS) 7900HT de Applied Biosystems (California, EEUU). Este equipo utiliza una placa de 384 pocillos con lo que se incrementa el número de muestras que se pueden analizar simultáneamente respecto a otros equipos existentes en el mercado. Además, detecta un espectro de fluorescencia comprendido entre 500 y 660 nm, lo que le permite distinguir y cuantificar múltiples fluorocromos en cada pocillo de la placa (López-Calleja y col., 2007).

La técnica desarrollada en este trabajo emplea como diana secuencias especie-específicas del gen mitocondrial 12S ARNr y utiliza un fragmento conservado del gen nuclear 18S ARNr como sistema de control endógeno. La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del gen 12S ARNr obtenidas en trabajos anteriores para diversas especies de caza mayor y domésticas (Fajardo y col., 2006, 2007), permitió el diseño de tres parejas de cebadores (sistemas de PCR específicos de cérvidos) en zonas cuya secuencia incluía diferencias específicas de especie. Los cebadores específicos diseñados amplificaban fragmentos de 134 (12SCEQ-FW/12SCEQ-REV), 169 (12SDDQ-FW/12SDDQ-REV) y 120 pb (12SCCQ-FW/12SCCQ-REV) en el gen 12S ARNr de ciervo, gamo y corzo, respectivamente (resultados no mostrados). La selección de amplicones de pequeño tamaño es un factor especialmente crítico para el éxito de los ensayos de PCR en tiempo real, sobre todo en el análisis de muestras donde el ADN puede estar degradado (Hird y col., 2006).

Además de los sistemas de PCR específicos, se diseñó otra pareja de cebadores universales de eucariotas (18SEUDIR y 18SEUREV) a partir de secuencias del gen nuclear 18S ARNr disponibles en las bases de datos para varias especies animales. Estos cebadores amplifican un fragmento conservado de 140 pb del gen 18S ARNr, que se utilizó como control endógeno para normalizar los valores de C_t obtenidos en las reacciones de PCR específicas de ciervo, gamo y corzo. La principal ventaja del empleo de un sistema de PCR endógeno radica en que determinados factores que afectan al nivel de amplificación del ensayo, como son la presencia de inhibidores de la reacción o la integridad y la calidad del ADN recuperado de una muestra, se pueden ajustar al comparar el valor de C_t obtenido en la muestra problema con la

respuesta de amplificación obtenida con los sistemas de PCR específicos. Este hecho tiene un enorme interés, dada la variabilidad observada en los resultados de amplificación del ADN a partir de matrices alimentarias en función de factores como el estado de conservación y el tratamiento de procesado aplicado al producto (López.Andreo y col., 2005).

Para el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real descrita en este trabajo, en primer lugar, se evaluó la especificidad de los sistemas de PCR específicos de ciervo, gamo y corzo mediante el estudio de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas tras el análisis de los ADNs procedentes de diversas especies animales. Los sistemas específicos de cérvidos dieron lugar a los fragmentos esperados a partir del ADN de las correspondientes especies diana, con unos valores de C_t comprendidos entre 15,13 y 19,26 y un intervalo de T_m característico para ciervo, gamo y corzo (76,5-78 °C, 78-79,5 °C y 72-73 °C, respectivamente). En el resto de las especies analizadas, los valores de C_t estuvieron comprendidos entre 33,37 y 35,43. Por otra parte, al utilizar el sistema de control endógeno se amplificó el fragmento esperado de 140 pb con unos valores de C_t comprendidos entre 15,41 y 16,27 y una T_m de 83 a 84 °C (*Tabla 2*, pág. 128).

A continuación se procedió a la cuantificación de la presencia de ADN de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas binarias crudas y esterilizadas que contenían porcentajes del 0,1, 1, 5, 10 y 25% de la especie diana en una matriz de cerdo. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de C_t de las mezclas cárnicas binarias de ciervo, gamo y corzo. Los valores de C_t obtenidos en cada muestra (10 ng de ADN) con los correspondientes sistemas específicos de ciervo (C_{tCES}), gamo (C_{tDDS}) y corzo (C_{tCCS}), se normalizaron de acuerdo a las siguientes fórmulas (Rodríguez y col., 2004; 2005):

$$C_{tCE} = C_{tEU} * C_{tCES} / C_{tEUS} \text{ (para ciervo)}$$

$$C_{tDD} = C_{tEU} * C_{tDDS} / C_{tEUS} \text{ (para gamo)}$$

$$C_{tCC} = C_{tEU} * C_{tCCS} / C_{tEUS} \text{ (para corzo)}$$

donde: C_{tCE} , C_{tDD} y C_{tCC} , son los C_t normalizados de las muestras en los sistemas específicos de ciervo, gamo y corzo, respectivamente; C_{tEUS} es el valor de C_t obtenido para cada muestra y C_{tEU} es la media de los C_t obtenidos para cada recta estándar en el sistema endógeno. La concentración de ADN diana en una muestra problema se calcula interpolando el C_t normalizado obtenido en la correspondiente recta estándar de porcentajes conocidos de la especie diana en las mezclas.

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación con los sistemas de PCR específicos y el control endógeno, se analizaron estadísticamente siguiendo la metodología descrita por Camacho y col. (1993).

La *Figura 1* (pág. 129) muestra las rectas de calibrado obtenidas al analizar 10 ng de ADN extraído de las mezclas cárnicas binarias crudas de ciervo, gamo y corzo con los correspondientes sistemas específicos. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos permitió su validación a través del análisis de diferentes parámetros como la eficiencia, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión del método de cuantificación. De forma similar, se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos con las mezclas cárnicas esterilizadas (*Figura 2*, pág. 130).

La pendiente obtenida al representar el logaritmo de las concentraciones de ADN frente al incremento de los valores de C_t fue de $-3,34$ para el sistema específico de ciervo (*Figura 1a*), $-3,42$ para el de gamo (*Figura 1b*) y $-3,25$ para el de corzo (*Figura 1c*), correspondiendo el valor cercano a $-3,32$ a una eficiencia del 100%. Asimismo, las pendientes obtenidas al analizar las mezclas cárnicas esterilizadas de ciervo, gamo y corzo fueron de $-4,2$ (*Figura 2a*), $-3,4$ (*Figura 2b*) y $-3,8$ (*Figura 2c*), respectivamente.

El límite de cuantificación conseguido con las mezclas cárnicas crudas fue de 0,001, $5,93 \times 10^{-5}$ y $3,99 \times 10^{-5}$ % de ADN de ciervo, gamo y corzo, respectivamente. De igual modo, tras el análisis de las mezclas esterilizadas, los límites de cuantificación obtenidos fueron de 0,8, $1,4 \times 10^{-3}$ y $3,32 \times 10^{-4}$ % de ADN de ciervo, gamo y corzo, respectivamente.

La linealidad y sensibilidad de la técnica también se evaluaron con relación a los datos normalizados para las correspondientes mezclas cárnicas crudas (*Figura 1*, pág. 129) y esterilizadas (*Figura 2*, pág. 130) de ciervo, gamo y corzo. Se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: Test de *Cochran*, análisis de regresión, análisis de varianza *Lack of-Fit* y capacidad discriminante (Camacho y col., 1993).

El valor obtenido en el test de *t-Student* verificó la exactitud del método de cuantificación desarrollado, ya que el porcentaje de recuperación obtenido en las mezclas crudas y esterilizadas de las tres especies de interés estuvo próximo al 100%.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tipo de tratamiento térmico aplicado a la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación de cada especie diana en las correspondientes mezclas cárnicas. En consecuencia, la cuantificación de especies en un producto precisa de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado.

En los últimos años, la posibilidad de monitorizar en tiempo real el progreso de la reacción de PCR ha revolucionado las técnicas de cuantificación de ADN y ARN (Brodmann y Moor, 2003; López-Calleja y col., 2007). En este sentido, además de las numerosas aplicaciones en el campo del diagnóstico clínico y de la investigación básica, la técnica de PCR en tiempo real ha demostrado su eficacia en el área del análisis de alimentos, principalmente en la detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG) (Hernández y col., 2004; Toyota

y col., 2006; Freese y col., 2007; Chaouachi y col., 2008; Salvi y col., 2008), alérgenos alimentarios frecuentes como frutos secos y cereales (Brezná y col., 2006; Mustorp y col., 2008; Brezná y col., 2008; Demmel y col., 2008) y en la detección de microorganismos patógenos y alterantes (Chiang y col., 2007; De Martinis y col., 2007; Grady y col., 2008; Krascensicsova y col., 2008; Maede y col., 2008; Malorny y col., 2008; Ridley y col., 2008). Comparativamente con los estudios de PCR en tiempo real descritos para la diferenciación y cuantificación de carnes de especies domésticas como vaca, cerdo, oveja, pollo y pavo (Dooley y col., 2004; Rodríguez y col., 2004; López-Andreo y col., 2005; Laube y col., 2007; Tanabe y col., 2007; Eugster y col., 2008; Jonker y col., 2008), el número de trabajos publicados dirigidos a la detección cualitativa y cuantitativa de carnes procedentes de especies de caza mayor es mucho menor (Wolf y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Colombo, y col., 2004; Pfeiffer y col., 2004). Hasta donde llega nuestra información, no existen estudios que aborden la cuantificación mediante PCR en tiempo real de carnes procedentes de ciervo, gamo y corzo.

La identificación y cuantificación de ADN mediante la utilización de técnicas de PCR en tiempo real es una alternativa relativamente sencilla y eficaz frente a otras técnicas de análisis más lentas y laboriosas como la secuenciación (Colombo y col., 2004), PCR-RFLP (Fajardo y col., 2006) o PCR-SSCP (Rea y col., 1996; Chapela y col., 2007). Sin embargo, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de especies animales en matrices alimentarias presenta también algunas dificultades ligadas a determinados factores que pueden afectar al ADN diana, tales como su degradación y la variabilidad existente en la proporción de ADN de los distintos tejidos (grasa, músculo, etc.) (López-Andreo y col., 2006). Las principales ventajas que ofrece el empleo de la molécula SYBR[®] Green como marcador fluorescente son la posibilidad de su inclusión junto a los demás reactivos de la PCR y la capacidad para detectar los productos amplificados con una sensibilidad similar a la facilitada por las sondas fluorescentes específicas, pero con un coste menor (Sawyer y col., 2003; Aarts y col., 2006). Por otra parte, el inconveniente del uso de este marcador radica en que tanto los amplicones específicos como los no específicos generan señal, pudiendo aparecer falsos positivos como consecuencia de la unión del SYBR[®] Green a los productos de PCR inespecíficos (Laube y col., 2007). Por lo tanto, la especificidad de la técnica dependerá del riguroso diseño de los cebadores especie-específicos y de la optimización de la reacción de amplificación (Walker y col., 2004; Wang y col., 2006).

Puede concluirse que la técnica de PCR en tiempo real descrita en este trabajo permite la detección y cuantificación del ADN de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas en el intervalo comprendido entre el 0,1-0,8% y el 25%, en función de la especie y del tratamiento térmico aplicado a la muestra.

Detección cuantitativa de ADN de rebeco (*Rupicapra rupicapra*) y cabra montés (*Capra pyrenaica*) en mezclas cárnicas mediante técnicas de PCR en tiempo real empleando la molécula SYBR® Green y sondas TaqMan®

En este trabajo se describe el desarrollo de dos técnicas de PCR para la detección y cuantificación de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas crudas y esterilizadas. La primera aproximación emplea como sistema de detección el agente fluorescente SYBR® Green, mientras que la segunda utiliza sondas específicas TaqMan® para la hibridación. En ambos casos, el procedimiento de PCR en tiempo real se llevó a cabo en la plataforma de detección *LightCycler* (Roche Applied Science), que está equipada con la tecnología más innovadora para cuantificar los productos de PCR amplificados. Su gran flexibilidad permite el uso de un amplio abanico de formatos de detección, siendo el único equipo de PCR en tiempo real que dispone de 6 canales de detección a longitudes de onda distintas (530, 560, 610, 640, 670 y 710 nm) para trabajar con diferentes tipos de químicas fluorescentes: SYBR® Green, sondas TaqMan®, sondas FRET, sondas *scorpions* o *molecular beacon*, etc. (Rensen y col., 2005; Jonker y col., 2008).

En este estudio se emplearon como diana de detección fragmentos específicos del gen mitocondrial 12S ARN ribosómico y de la región mitocondrial D-loop de las especies de interés. Además, se utilizó un fragmento conservado del gen nuclear 18S ARNr de eucariotas como sistema de control endógeno. La comparación y el estudio de las secuencias nucleotídicas del gen 12S ARNr obtenidas en trabajos anteriores para diversas especies de caza mayor y domésticas (Fajardo y col., 2006, 2007), permitió el diseño de una pareja de cebadores (12SRPQFW-12SRPQREV) para la amplificación de un fragmento específico de 133 pb en rebeco. Sin embargo, el reducido número de diferencias nucleotídicas existentes entre las secuencias del gen 12S ARNr de la especie *C. pyrenaica* y de otras especies estrechamente relacionadas como la cabra doméstica (*C. hircus*), impidió la utilización de este marcador para la detección cuantitativa de carnes procedentes de cabra montés. Así, para la identificación de esta especie se seleccionó la región mitocondrial D-loop debido a la alta variabilidad y tasa de mutación que presenta este gen (Sbisà y col., 1997). Los cebadores diseñados en la región mitocondrial D-loop, PIDLOOPQFW y PIDLOOPQREV, amplificaron un fragmento específico de 88 pb en la cabra montés (Fajardo y col., 2007).

Para diseñar la pareja de cebadores universales de eucariotas que formaban el sistema endógeno (18SpEUDIR y 18SpEUINV), se purificaron y secuenciaron los amplicones obtenidos en el gen 18S ARNr con los cebadores de eucariotas en las siguientes especies animales: rebeco (AM711876), cabra montés (AM711870), muflón (AM711874), ciervo (AM711872), gamo (AM711873), corzo (AM711868), vaca (AM711877), oveja (AM711875), cabra (AM711869) y cerdo (AM711871). El alineamiento y análisis de las secuencias obtenidas facilitó el diseño de los cebadores 18SpEUDIR y 18SpEUINV, que amplificaron un fragmento conservado de 141 pb

del gen 18S ARNr y se utilizaron como control endógeno para normalizar los valores de C_t obtenidos en las reacciones específicas de amplificación de ADN de rebeco y cabra montés.

Como se ha señalado anteriormente, en primer lugar se procedió a la detección cuantitativa en tiempo real de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas mediante el empleo de los sistemas específicos (12SRPQFW-12SRPQREV y PIDLOOPQFW-PIDLOOPQREV) y endógeno (18SpEUDIR-18SpEUINV) descritos y el agente fluorescente SYBR® Green. Inicialmente se evaluó la especificidad de los sistemas de PCR específicos de rebeco y cabra montés mediante el estudio de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas tras el análisis de los ADNs procedentes de diversas especies animales. Los sistemas de PCR diseñados dieron lugar a los fragmentos esperados a partir del ADN de rebeco y cabra montés con unos valores de C_t de 16,03 y 21,85, respectivamente, y un intervalo de T_m de 77 a 78 °C. En el resto de especies estudiadas, los valores de C_t estuvieron comprendidos entre 32,80 y 36,37. Por otra parte, al utilizar el sistema de control endógeno se amplificó el fragmento esperado de 141 pb con unos valores de C_t situados en el intervalo entre 17,76 y 22,25 y una T_m de 85,3-87 °C (*Tabla 2*, pág. 136).

Tras evaluar la especificidad de la técnica, se procedió a la cuantificación de la presencia de ADN de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas binarias crudas y esterilizadas, que contenían porcentajes del 0,1, 1, 5, 10 y 25% de la especie diana en una matriz de cerdo. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a la recta estándar obtenida a partir de los valores de C_t de las mezclas cárnicas binarias de rebeco y cabra montés. Los valores de C_t obtenidos a partir del ADN de cada muestra (5 y 25 ng de ADN de las mezclas de rebeco y cabra montés, respectivamente) al emplear los correspondientes sistemas de PCR específicos, se normalizaron siguiendo el modelo matemático aplicado en el trabajo anterior (Fajardo y col., 2008).

En la *Figura 1* (pág. 137) se muestran los perfiles de fluorescencia obtenidos a partir de los productos de PCR generados al analizar las mezclas cárnicas crudas de rebeco (*Figura 1a*) y cabra montés (*Figura 1b*) con los correspondientes sistemas de PCR específicos. De forma similar, en la *Figura 2* (pág. 138) aparecen los perfiles de fluorescencia obtenidos tras el análisis de las mezclas cárnicas tratadas térmicamente de rebeco (*Figura 2a*) y cabra montés (*Figura 2b*). Hay que señalar que las mezclas que contenían un 25% de rebeco en cerdo no se incluyeron en las rectas estándar debido a la saturación que se producía en los valores de fluorescencia con este porcentaje.

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación con los sistemas de PCR específicos y el control endógeno, se analizaron estadísticamente siguiendo el protocolo de validación descrito con anterioridad (Camacho y col., 1993; ICH, 2005).

Las Figuras 3 y 4 (pág. 139 y 140, respectivamente) muestran las rectas de calibrado obtenidas al analizar el ADN extraído de las mezclas cárnicas binarias crudas y esterilizadas de rebeco (5 ng) y cabra montés (25 ng) con los correspondientes sistemas específicos. Para realizar el tratamiento estadístico de los datos obtenidos se calculó la eficiencia, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión del método de cuantificación.

La pendiente obtenida al representar el logaritmo de las concentraciones de ADN frente al incremento de los valores de C_t fue de $-3,32$ para el sistema específico de rebeco (Figura 3a) y de $-3,34$ para el de cabra montés (Figura 3b), correspondiendo el valor cercano a $-3,32$ a una eficiencia del 100%. Asimismo, los datos de las pendientes al analizar las mezclas cárnicas esterilizadas de rebeco y cabra montés fueron de $-3,44$ (Figura 4a) y $-4,26$ (Figura 4b), respectivamente.

El límite de cuantificación obtenido con las mezclas cárnicas crudas fue de $1,2 \times 10^{-5}$ y 0,04% de ADN de rebeco y cabra montés, respectivamente. De forma similar, los límites de cuantificación obtenidos tras el análisis de las mezclas esterilizadas fueron de $6,4 \times 10^{-4}$ y 0,8% de ADN de rebeco y cabra montés, respectivamente. Estos resultados demuestran la utilidad de los cebadores diseñados sobre fragmentos de ADN de pequeño tamaño para detectar con suficiente sensibilidad aquellos ADNs degradados como consecuencia del procesado térmico u otros tratamientos aplicados a los alimentos (Frezza y col., 2003).

Los parámetros estadísticos del test de *Cochran*, análisis de regresión, análisis de varianza *Lack of-Fit* y capacidad discriminante (Camacho y col., 1993; ICH, 2005) permitieron evaluar la linealidad y sensibilidad de la técnica para la detección y cuantificación de rebeco y cabra montés en las mezclas cárnicas crudas (Figura 3, pág. 139) y esterilizadas (Figura 4, pág. 140).

El valor obtenido después de realizar el test de *t-Student* verificó la exactitud del método desarrollado, ya que el porcentaje de recuperación obtenido en las mezclas crudas y esterilizadas de las dos especies de interés resultó próximo al 100%.

Al igual que en el trabajo descrito anteriormente (Fajardo y col., 2008), los resultados obtenidos en este estudio indican que el tipo de tratamiento térmico aplicado a la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación de cada especie diana en las correspondientes mezclas cárnicas. En consecuencia, la cuantificación de especies en un producto precisa de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la técnica de PCR en tiempo real empleando la molécula de SYBR® Green permite la identificación y cuantificación específica de ADN de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas en el intervalo comprendido entre el 0,1-0,8% y el 10-25%, en función de la especie y del tratamiento térmico aplicado a la muestra.

En la segunda parte del estudio, se abordó el desarrollo de una alternativa a la técnica de PCR en tiempo real anteriormente descrita. Ésta se basa en el empleo de los sistemas de PCR específicos de rebeco (12SRPQFW-12SRPQREV) y cabra montés (PIDLOOPQFW-PILOOPQREV) y dos sondas TaqMan® internas, específicas para cada una de estas dos especies. A diferencia del reactivo SYBR® Green, las sondas TaqMan® hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana evitando los falsos positivos si se generan productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores (Zhang y col., 2007; Jonker y col., 2008). Además, en esta técnica se empleó un fragmento conservado del gen nuclear 18S amplificado por los cebadores universales (18SpEUDIR y 18SpEUINV) y una sonda conservada como sistema de control endógeno para normalizar los valores de C_t obtenidos en las reacciones específicas de amplificación de ADN de rebeco y cabra montés (Fajardo y col., 2008).

La sonda TaqMan® es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. El fluorocromo situado en el extremo 5' se llama donador (*reporter*) y el del extremo 3' recibe el nombre de aceptor (*quencher*). Cuando la sonda (que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores) está íntegra, la proximidad del donador y del aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando ésta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena de ADN, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa provoca la liberación del donador del extremo 5' de la sonda, que al separarse del aceptor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del donador (Dooley y col., 2004; López-Calleja y col., 2007).

Para diseñar las sondas TaqMan® específicas de rebeco (CHAMOISTM) y cabra montés (IBEXTM) se alinearon y compararon las secuencias del gen 12S ARNr y de la región D-loop de varias especies animales obtenidas en trabajos anteriores. El estudio del alineamiento permitió elegir zonas internas a las secuencias de ADN delimitadas por los sistemas específicos, que incluyesen suficientes diferencias especie-específicas. Por otra parte, el alineamiento y análisis de las secuencias obtenidas con los cebadores de eucariotas en el gen 18S ARNr de varias especies animales facilitó el diseño de la sonda TaqMan® conservada 18SPROBE (TibMolBiol, Berlin, Alemania).

Para el desarrollo de la técnica se evaluó, en primer lugar, la especificidad de los sistemas de PCR específicos de rebeco y cabra montés (formados por las parejas de cebadores de ambas especies y sus correspondientes sondas TaqMan® específicas). Tras el análisis de los ADNs procedentes de diversas especies animales, los sistemas de PCR específicos de rebeco y cabra montés dieron lugar a los fragmentos esperados a partir del ADN de las especies diana

con unos valores de C_t de 17,65 y 19,90, respectivamente. Para el resto de especies se obtuvo un C_t de 45 en ambos sistemas, es decir, no hubo señal de amplificación tras 45 ciclos de PCR. Como ya se ha señalado, los métodos que emplean sondas TaqMan® requieren la unión específica de la sonda fluorescente a la secuencia diana delimitada por cada uno de los sistemas de PCR, no requiriéndose análisis posteriores (curvas de desnaturalización térmica) como ocurre al utilizar la molécula SYBR® Green (Sawyer y col., 2003; Aarts y col., 2006; López-Andreo y col., 2006).

Por otra parte, con el empleo del sistema de control endógeno (cebadores y sonda de eucariotas del gen 18S ARNr), se amplificó el fragmento esperado de 141 pb en todas las especies analizadas, con unos valores de C_t comprendidos entre 16,68 y 17,90.

Tras evaluar la especificidad de la técnica, se procedió a la cuantificación de la presencia de ADN de rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas binarias crudas y esterilizadas que contenían porcentajes del 0,1, 1, 5, 10 y 25% de la especie diana en una matriz de cerdo. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de C_t de las mezclas cárnicas binarias de rebeco y cabra montés (Fajardo y col., 2008).

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación con los sistemas de PCR específicos y el control endógeno se analizaron estadísticamente de acuerdo con las pautas ya descritas en otros trabajos (Camacho y col., 1993; ICH, 2005; Fajardo y col., 2008). También se determinó la linealidad y sensibilidad de la técnica con relación a los datos normalizados de las correspondientes mezclas cárnicas crudas y esterilizadas de rebeco y cabra montés. Además, se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: Test de *Cochran*, análisis de regresión, análisis de varianza *Lack of-Fit* y capacidad discriminante (Camacho y col., 1993; ICH, 2005; Fajardo y col., 2008).

Del análisis global de los resultados obtenidos puede deducirse que el empleo de sondas TaqMan® en la técnica de PCR en tiempo real, mejora la especificidad, eficiencia y sensibilidad a la hora de detectar y cuantificar el ADN de rebeco y cabra montés, con respecto al método que emplea la molécula inespecífica SYBR® Green (Fajardo y col., 2008). Sin embargo, cabe señalar como inconveniente el alto coste de las sondas y la dificultad ligada al diseño y disponibilidad de los oligonucleótidos que componen el sistema TaqMan-PCR (sondas y cebadores específicos).

Como ya se ha señalado, los ensayos de PCR en tiempo real proporcionan resultados numéricos (C_t) según transcurre la reacción de PCR que permiten la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Laube y col., 2007; López-Calleja y col., 2007). En condiciones ideales, un método cuantitativo debe ser rápido, sencillo y económico. En este sentido, con el equipo *LightCycler* (Roche, Mannheim, Alemania) la PCR se completa en aproximadamente 45 minutos, gracias al empleo de pequeños capilares de vidrio que permiten

maximizar la velocidad de la reacción. Además, se evita el manejo de placas, más susceptibles a las contaminaciones que el sistema de capilares (Rensen y col., 2005; Grady y col., 2008).

Las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en este trabajo constituyen una alternativa a otras técnicas de análisis del ADN para garantizar la identificación y cuantificación específica de la carne de rebeco y cabra montés en los programas de inspección de la industria cárnica.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



PRIMERA. Mediante una técnica de PCR-RFLP y utilizando las enzimas de restricción seleccionadas en este trabajo y los marcadores genéticos mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, así como el gen nuclear *MC1R*, se han obtenido perfiles de restricción especie-específicos que han permitido la identificación de carnes procedentes de ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés, muflón y jabalí, y su diferenciación de otras carnes de consumo habitual tanto en productos cárnicos frescos como curados.

SEGUNDA. Mediante una técnica de PCR cualitativa y con los cebadores específicos de ciervo, gamo, corzo, rebeco, cabra montés y muflón diseñados en los genes mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, ha sido posible la identificación específica de carnes de estas especies animales. En mezclas cárnicas, el límite de detección alcanzado fue del 0,1% para todas las especies analizadas. La sensibilidad de los ensayos no varió al analizar productos cárnicos frescos, curados y tratados por calor.

TERCERA. Mediante una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real y empleando los cebadores especie-específicos diseñados en los genes mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, ha sido posible la identificación y cuantificación de ADN procedente de carnes de ciervo, gamo, corzo, rebeco y cabra montés en mezclas cárnicas en el intervalo comprendido entre el 0,1% y el 25%. El empleo de sondas TaqMan[®] permitió mejorar los resultados de especificidad, eficiencia, sensibilidad y exactitud respecto a los obtenidos con el intercalador fluorescente SYBR[®] Green. El tipo de procesado del producto, el tejido o la especie analizada influyeron en las ecuaciones de cuantificación de la especie diana.

FIRST. The development of a PCR-RFLP technique using the restriction endonucleases selected in this work and the 12S ribosomal RNA and D-loop mitochondrial markers, as well as the nuclear *MC1R* gene, allowed the unequivocal identification of meats from red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex, mouflon and wild boar, and their differentiation of meats from domestic species in raw and cured meat products.

SECOND. The qualitative polymerase chain reaction developed with the specific primers of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex and mouflon designed in the mitochondrial 12S ribosomal RNA and D-loop genes, allowed the specific identification of meats from these animal species. In meat mixtures, the detection limit of the PCR assays was set on 0.1% for all the target species. The sensitivity of the PCR was not modified when raw, cured and heat-treated meat products were analysed.

THIRD. A quantitative real-time PCR assay based on the use of the species-specific primers designed in the mitochondrial 12S ribosomal RNA and D-loop genes, enabled the identification and quantification of DNA from meats of red deer, fallow deer, roe deer, chamois and pyrenean ibex in meat mixtures in the range of 0.1% to 25%. TaqMan[®] probes improves the specificity, sensitivity, efficiency and accuracy with respect to the fluorescent SYBR[®] Green molecule. Different calibration curves should be used in accordance with the treatment applied to the product, the tissue matrix or the species analysed.

CAPÍTULO VI

TRABAJO FUTURO



Utilización de microsatélites de ADN para la diferenciación de carnes y productos cárnicos procedentes de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*)

La carne de jabalí se considera una *delicatessen* y posee unos atributos claramente diferenciados de la del cerdo doméstico. Por ello, en los últimos años se ha observado una tendencia hacia la producción y comercialización de la carne de jabalí como alternativa a las carnes de otras especies de consumo habitual (Skewes, 2003). La sustitución de carne de jabalí por cerdo doméstico, así como, la comercialización de carne de individuos híbridos como si fueran jabalíes puros constituyen un fraude económico (Gongora y col., 2003; Koutsogiannouli y col., 2008). Por ello, es conveniente disponer de técnicas analíticas que permitan garantizar la trazabilidad y autenticidad de los productos comercializados.

Los resultados obtenidos con la técnica de PCR-RFLP desarrollada en esta tesis doctoral permitieron la diferenciación de jabalí europeo y cerdo doméstico mediante la amplificación específica de un fragmento de 795 pb en el gen nuclear *MC1R* tanto en jabalí como en cerdo y la posterior digestión de los amplicones obtenidos con las endonucleasas de restricción *BspHI* y *BstUI* (pág. 96). Cabe mencionar que debido al elevado tamaño del fragmento amplificado (795 pb), esta técnica está indicada para analizar productos crudos o curados. Sin embargo, no sería aplicable para el análisis de productos sometidos a tratamientos de procesado más intensos como los empleados para la obtención de patés, estofados, conservas, etc., donde el ADN está muy degradado (Fajardo y col., 2006; 2008). En consecuencia, se deben buscar y desarrollar métodos alternativos aplicables al análisis de productos tratados por calor que permitan, además, la identificación y detección de polimorfismos o mutaciones puntuales (SNPs) para hacer posible la discriminación de las subespecies salvaje y doméstica de *Sus scrofa* (Giuffra y col., 2000; Fajardo y col., 2008).

Una de las opciones para llevar a cabo la diferenciación de jabalí europeo y cerdo doméstico podría ser el desarrollo de la **tecnología de microsatélites de ADN**. Los microsatélites son marcadores de ADN de última generación que constituyen una poderosa herramienta para la caracterización genética de individuos, poblaciones y especies animales (Edwards y col., 2000; Arranz y col., 2001; Megens y col., 2008). El ADN nuclear posee una característica interesante basada en las diferencias existentes en el número de copias de determinadas secuencias nucleotídicas (regiones no codificantes del genoma con un alto grado de variabilidad) que se repiten a lo largo de dicho genoma. La generalización de la utilización de estas secuencias repetitivas como marcadores genéticos, se debe precisamente a que se amplifican por PCR y a la facilidad de identificar alelos. Cada uno de los alelos de un individuo difiere en el número de unidades repetitivas que contiene en un *locus* determinado. Debido a las elevadas tasas de mutación que presentan las secuencias repetitivas y al gran número de alelos

presentes en el genoma, estas regiones constituyen interesantes marcadores para la identificación de especies (Haberfeld y col., 1991).

La técnica de microsatélites consiste en el empleo de marcadores complementarios a regiones del genoma animal que se componen de una serie de repeticiones en *tandem* de 2 a 6 nucleótidos. Las diferencias existentes en el número de repeticiones del microsatélite se detectan mediante amplificación por PCR y se visualizan como fragmentos de ADN de diferente longitud (alelos expresados en pares de bases) (Figura 15). Los microsatélites presentan ventajas interesantes a tener en cuenta en la identificación de especies tales como: a) la heredabilidad; b) su elevado grado de polimorfismo permite disponer de un gran número de alelos distintos en cada *locus*, confiriéndoles una gran capacidad de discriminación; c) su pequeño tamaño hace que sean fácilmente identificables mediante PCR en productos esterilizados o altamente procesados; y d) ya que las zonas que flanquean muchos de los microsatélites estudiados son muy conservadas entre especies pertenecientes a la misma familia e incluso al mismo género, los cebadores empleados para amplificar un microsatélite en una especie se pueden emplear también en otras (Guo y col., 2005; Sharma y col., 2006).

El estudio automatizado de los microsatélites permite la identificación de los alelos de cada *locus*, y la consiguiente obtención de datos poblacionales de los individuos analizados, tales como las frecuencias alélicas (frecuencia relativa de un alelo en un *locus* genético determinado). La presencia de “alelos particulares” ofrece un gran interés para la diferenciación de razas o subespecies, puesto que al tratarse de alelos característicos de una determinada población, su detección permite la asignación de un individuo a una raza o subespecie en particular. Las modernas técnicas electroforéticas, que emplean secuenciadores automáticos con tecnología fluorescente, ofrecen ventajas adicionales para la correcta tipificación de los microsatélites, dado que permiten conocer con exactitud tanto los tamaños alélicos (pb), como los distintos genotipos a los que da lugar su polimorfismo (Ciampolini y col., 2006; Royo y col., 2007).

En cuanto al tipo de marcador a utilizar, éste debe presentar además de un alto grado de polimorfismo, baja tasa de mutación, elevada reproducibilidad y precisión, que muestren una segregación independiente con los otros marcadores al ser combinados en la prueba, y que no presenten alelos nulos (alelos que no pueden ser amplificados debido a una mutación en el punto de hibridación del cebador, catalogándose como homocigotos los individuos que los portan) (Dawson y col., 1997; Castillo y col., 2003).

Aunque el empleo de esta técnica en la identificación de especies en los alimentos ha sido muy escasa (Castillo y col., 2003; Mascini y col., 2005; Ciampolini y col., 2006; Orrú y col., 2006; Sharma y col., 2006), sí se ha utilizado ampliamente en la identificación y caracterización genética de numerosas especies animales de abasto, tales como vaca (Edwards y col., 2000; Maudet y col., 2002), oveja (Arranz y col., 2001; Álvarez y col., 2004), cabra (Luikart y col., 1999;

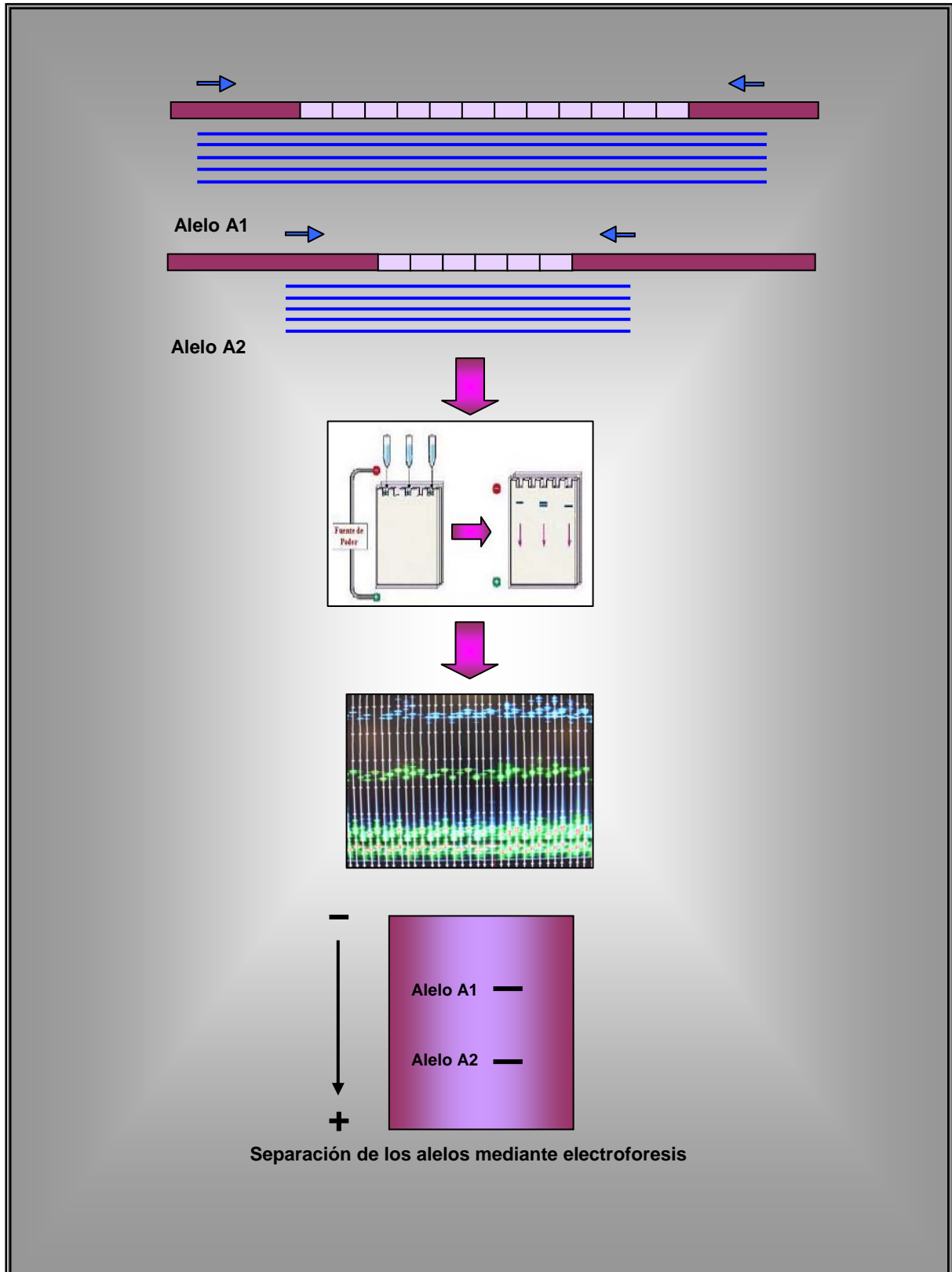


Figura 15. Amplificación de un microsatélite mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados ($\Rightarrow\Leftarrow$) son complementarios a las regiones que flanquean las secuencias repetitivas (■). Los productos de la amplificación, cuyo tamaño depende del número de unidades repetitivas (□) que contenga el microsatélite, se separan mediante electroforesis en geles de acrilamida. En caso de individuos homocigotos sólo aparecerá una banda, mientras que en individuos heterocigotos se observarán dos bandas.

Fan y col., 2008) y cerdo (Guo y col., 2005; Sancristobal y col., 2006; Megens y col., 2008). A pesar de que existen menos trabajos publicados, también se han descrito microsatélites en algunas especies de caza mayor como cérvidos (Tokarskaya y col., 2000; Poetsch y col., 2001; Royo y col., 2007), bóvidos salvajes (Petit y col., 1997; Pérez y col., 2002) y suidos como el jabalí (Rejduch y col., 2004; Rodríguez y col., 2008). Vernesi y col. (2003) estudiaron las relaciones genéticas existentes entre poblaciones de jabalíes originarios de Italia y Hungría mediante el empleo de 9 marcadores microsatélites. Rejduch y col. (2004) utilizaron 7 marcadores microsatélites para analizar la variabilidad genética existente entre poblaciones de jabalíes y de la raza porcina *Large White* en Polonia. Asimismo, Rodríguez y col. (2008) estudiaron la diversidad genética y riqueza alélica existentes en poblaciones españolas de jabalíes y cerdos a partir del análisis de un total de 18 marcadores microsatélites. Finalmente, Scandura y col. (2008) emplearon 10 marcadores microsatélites para analizar la variabilidad y relaciones genéticas existentes entre poblaciones de jabalíes y razas porcinas ubicadas en distintas zonas geográficas de Europa (Austria, España, Francia, Hungría, Italia y Polonia), evidenciando la existencia de “alelos particulares” o exclusivos de diversas poblaciones de jabalíes.

En este trabajo se propone el empleo de **microsatélites de ADN** para identificar y diferenciar carnes procedentes de jabalí europeo y cerdo doméstico. La metodología del trabajo a seguir sería la siguiente:

- 1) Selección de marcadores microsatélites adecuados. Existen actualmente numerosas secuencias de microsatélites depositadas en bases de datos (<http://www.projects.roslin.ac.uk>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o <http://www.marc.usda.gov/genome>) y estudios que indican los marcadores microsatélites más empleados en jabalí y cerdo doméstico (Megens y col., 2008; Rodríguez y col., 2008; Scandura y col., 2008).
- 2) Selección de un número representativo de muestras de carne de jabalí europeo y cerdo doméstico procedentes de distintos orígenes y regiones geográficas.
- 3) Amplificación por PCR de los marcadores seleccionados a partir del ADN extraído de las muestras de carne seleccionadas de cada una de las subespecies porcinas objeto de estudio.
- 4) Selección de aquellos microsatélites que proporcionen los perfiles electroforéticos más adecuados. Se deben elegir un número suficiente de marcadores para la diferenciación de las subespecies de interés.
- 5) Empleo de un secuenciador automático para la separación electroforética en geles de acrilamida de todos los productos de PCR obtenidos. Identificación alélica, en

cada individuo y con cada marcador, mediante el uso de diversos programas informáticos (GENESCAN ANALYSIS y GENOTYPER SOFTWARE).

- 6) Utilización de los marcadores microsatélites elegidos en el análisis de muestras comerciales a fin de comprobar la aplicabilidad de la técnica para determinar el origen animal de productos cárnicos de jabalí y cerdo doméstico.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA



- AARTS, H.J.M., BOUW, E.M., BUNTJER, J.B., LENSTRA, J.A. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2006). Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%. **Journal of AOAC International** 89, 1443-1446.
- ABDEL-RAHMAN, S.M. y AHMED, M.M.M. (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. **Food Control** 18, 1246-1249.
- ABDULMAWJOOD, A. y BULTE, M. (2001). Snail species identification by RFLP-PCR and designing of species-specific oligonucleotide primers. **Journal of Food Science** 66, 1287-1293.
- ABE, H. y OKUMA, E. (1995). Discrimination of meat species in processed meat-products based on the ratio of histidine dipeptides. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology** 42, 827-834.
- AIDA, A.A., CHE MAN, Y.B., WONG, C.M.V.L., RAHA, A.R. y SON, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. **Meat Science** 69, 47-52.
- AIDOO, K.E. y HAWORTH, R.J.P. (1995). Nutritional and chemical composition of farmed venison. **Journal of Human Nutrition and Dietetics** 8, 441-446.
- ALI, B.A., HUANG, T.H., QIN, D.N. y WANG, X.M. (2004). A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 14, 443-453.
- AL-JOWDER, O., KEMSLEY, E.K. y WILSON, R.H. (1997). Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: a feasibility study. **Food Chemistry** 59, 195-201.
- ÁLVAREZ, I., ROYO, L.J., FERNÁNDEZ, I., GUTIÉRREZ, J.P., GÓMEZ, E. y GOYACHE, F. (2004). Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. **American Society of Animal Science** 82, 2246-2252.
- ÁLVAREZ-BUSTO, J., GARCÍA-ETXEBARRIA, K., HERRERO, J., GARÍN, I. y JUGO B.M. (2007). Diversity and evolution of the Mhc-DRB1 gene in the two endemic Iberian subspecies of Pyrenean chamois, *Rupicapra pyrenaica*. **Heredity** 99, 406-413.
- ANDREWS, C.D., BERGER, R.G., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1992). Detection of beef, sheep, deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of AOAC International** 75, 572-576.
- ARRANZ, J.J., BAYÓN, Y. y SAN PRIMITIVO, F. (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. **Genetic Selection Evolution** 33, 529-542.
- ARSLAN, A., ILHAK, I., CALICIOGLU, M. y KARAHAN M. (2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **Journal of Muscle Foods** 16, 37-45.
- ARSLAN, A., ILHAK, O.I. y CALICIOGLU, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. **Meat Science** 72, 326-330.

- ARUN, O.O. y UGUR, M. (2000). Animal species determination in sausages using an SDS-PAGE technique. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 51, 49-53.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., RODRÍGUEZ, M.A., LOBO, E., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2001). Genetic differentiation between wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) by PCR-RFLP analysis of an alpha-actin gene fragment. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 52, 131-134.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., RODRÍGUEZ, M.A., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2003). Identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1169-1172.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control** 19, 1-8.
- ASHOOR, S.H., MONTE, W.C. y STILES, P.G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 71, 397-403.
- ASLAM, M., HOGAN, J. y SMITH, L. (2003). Development of a PCR-based assay to detect shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology** 20, 345-350.
- AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A. y SAUNDERS, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review Ecological Systematics** 18, 489-522.
- AYAZ, Y., AYAZ, N.D. y EROL, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Muscle Foods** 17, 214-220.
- BAKSHI, S.B., RAO, K.L., SHARMA, K.N. y KUMAR, A. (1985). Counter-immunoelectrophoresis for rapid identification of type species in mixed meats of goat, camel, buffalo and deer. **Indian Journal of Animal Sciences** 55, 971-973.
- BARROSO, A., DUNNER, S. y CAÑÓN, J. (1998). Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science** 76, 1535-1538.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1992). FINS (Forensically Informative Sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. **BioTechniques** 12, 408-411.
- BATAILLE, M., CRAINIC, K., LETERREUX, M., DURIGON, M. y DE MAZANCOURT, P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. **Forensic Science International** 99, 165-170.
- BELLIS, C., ASHTON, K.J., FRENEY, L., BLAIR, B. y GRIFFITHS, L.R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. **Forensic Science International** 134, 99-108.
- BERTOLINI, R., ZGRABLIC, G. y CUFFOLO, E. (2005). Wild game meat: products, market,

legislation and processing controls. **Veterinary Research Communications** 29, 97-100.

BOTTERO, M.T., DALMASSO, I.A., NUCERA, D., TURI, R.M, ROSATI, S., SQUADRONE, S., GORIA, M. y CIVERA, T. (2003) Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. **Journal of Food Protection** 66, 2307-2312.

BOWDITCH, B.M., ALBRIGHT, D.G., WILLIAMS, J.G. y BRAUN, M.J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology** 224, 294-309.

BOYAPALLE, S., WESLEY, I.V., HURD, H.S. y REDDY, P.G. (2001). Comparison of culture, multiplex and 5'nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. **Journal of Food Protection** 64, 1352-1361.

BRANCIARI, R., AVELLINI, P., SUKASI-SANGAMAYYA, R., DI ANTONIO, E. y REA, S. (2000). Analisi PCR-RFLP per la determinazione di specie in prodotti carnei trattati termicamente. **Industrie Alimentari** 39, 313-318.

BRAZA, F. (2003). Gamo – *Dama dama*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L.M., Salvador, A. (Eds.), Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España. Disponible on line en: <http://www.vertebradosibericos.org>.

BREZNÁ, B., HUDECOVA, L. y KUČHTA, T. (2006). A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food. **European Food Research and Technology** 223, 373-377.

BREZNÁ, B. y KUČHTA, T. (2008). A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of pecan nuts in food. **European Food Research and Technology** 226, 1113-1118.

BRODMANN, P.D., NICHOLAS, G., SCHALTENBRAND, P. e ILG, E.C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. **European Food Research and Technology** 212, 491-496.

BRODMANN, P.D. y MOOR, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. **Meat Science** 65, 599-607.

BRZEZINSKI, J.L. (2005). Detection of crustacean DNA and species identification using a PCR-restriction fragment length polymorphism method. **Journal of Food Protection** 68, 1866-1873.

BUCHER, K., SZALAI, G., MARTI, E., GRIOT-WENK, M.E. y LAZARY, S. (1996). Tumour suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. **Research in Veterinary Science** 61, 114-119.

BUNTJER, J.B. y LENSTRA, J.A. (1998). Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 21, 121-127.

BUNTJER, J.B., LAMINE, A., HAAGSMA, N. y LENSTRA, J.A. (1999). Species identification by oligonucleotide hybridisation: the influence of processing of meat products. **Journal of the**

Science of Food and Agriculture 79, 53-57.

CALVO, J.H., ZARAGOZA, P. y OSTA, R. (2001). A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **Journal of Animal Science** 79, 2108-2112.

CALVO, J.H., OSTA, R. y ZARAGOZA, P. (2002). Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and paté. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 5265-5267.

CAMACHO, M.A., TORRES, A.I., GIL-ALEGRE, M.E., OBREGÓN, M.M. y RUIZ, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. **STP Pharma Pratiques** 3, 197-202.

CARRIÓN, D., DAY, A., EVANS, G., MITSUHASHI, T., ARCHIBALD, A., HALEY, C., ANDERSSON, L. y PLASTOW, G. (2003). The use of MC1R and KIT genotypes for breed characterisation. **Archivos de Zootecnia** 52, 237-244.

CASAS, C., TORMO, J., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1984a). Detection and partial characterization of soluble pig muscle proteins by immunoelectrophoresis in agarose gels. **Journal of Food Technology** 19, 283-287.

CASAS, C., TORMO, J., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1984b). Detection and partial characterization of soluble proteins of beef muscle by immunoelectrophoresis in agarose gels. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 35, 793-796.

CASAS, C., TORMO, J., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1985). The detection and partial characterization of horse muscle soluble proteins by immunoelectrophoresis in agarose gels. **Meat Science** 12, 31-37.

CASSINELLO, J. (2003). Muflón – *Ovis aries*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L.M., Salvador, A. (Eds.), Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España. Disponible on line en: <http://www.vertebradosibericos.org>.

CASTILLO, A.G.F., MARTÍNEZ, J.L. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (2003). Identification of Atlantic hake species by a simple PCR-based methodology employing microsatellite loci. **Journal of Food Protection** 66, 2130-2134.

CHAOUACHI, M., EL MALKI, R., BERARD, A., ROMANIUK, M., LAVAL, V., BRUNEL, D. y BERTHEAU, Y. (2008). Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four Solanaceae in GMO analysis: Potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*) and pepper (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 1818-1828.

CHAPELA, M.J., SÁNCHEZ, A., SUÁREZ, M.I., PÉREZ-MARTÍN, R.I. y SOTELO, C.G. (2007). A rapid methodology for screening hake species (*Merluccius* spp.) by single-stranded conformation polymorphism analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 6903-6909.

CHEN, F.C. y HSIEH, Y.H. (2000). Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of AOAC International** 83, 79-85.

- CHIANG, Y.C., FAN, C.M., LIAO, W.W., LIN, C.K. y TSEN, H.Y. (2007). Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence. **Journal of Food Protection** 70, 2855-2859.
- CHIAPPINI, B., BRAMBILLA, G., AGRIMI, U., VACCARI, G., AARTS, H.J., BERBEN, G., FREZZA, D. y GIAMBRA, V. (2005). Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. **Journal of AOAC International** 88, 1399-1403.
- CHIKUNI, K., TABATA, T., SAITO, M. y MONMA, M. (1994). Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. **Animal Science and Technology** 65, 571-579.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C., BOOTH, C., LAWLEY, W. y HIRD, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. **Meat Science** 70, 727-732.
- CHOU, C.C., LIN, S.P., LEE, K.M., HSU, C.T., VICKROY, T.W. y ZEN, J.M. (2007). Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** 846, 230-239.
- CIAMPOLINI, R., CETICA, V., CIANI, E., MAZZANTI, E., FOSELLA, X., MARRONI, F., BIAGETTI, M., SEBASTIANI, C., PAPA, P., FILIPPINI, G., CIANCI, D. y PRESCIUTTINI, S. (2006). Statistical analysis of individual assignment tests among four cattle breeds using fifteen STR loci. **Journal of Animal Science** 84, 11-19.
- COCKETT, N.E., SHAY, T.L. y SMIT, M. (2001). Analysis of the sheep genome. **Physiological Genomics** 7, 69-78.
- COLGAN, S., O'BRIEN, L., MAHER, M., SHILTON, N., McDONNELL, K. y WARD, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. **Food Research International** 34, 409-414.
- COLOMBO, F., MARCHISIO, E., PIZZINI, A. y CANTONI, C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. **Meat Science** 61, 291-294.
- COLOMBO, F., CARDIA, A., RENON, P. y CANTONI, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. **Meat Science** 66, 753-755.
- COMINCINI, S., SIRONI, M., BANDI, C., GIUNTA, C., RUBINI, M. y FONTANA, F. (1996). RAPD analysis of systematic relationships among the *Cervidae*. **Heredity** 76, 215-221.
- COOPER, N. (2002). Wild game and specialty meats. **Diabetes self management** 19, 73-76.
- CORTIJO, F. (2003). Una empresa busca dehesas para granja de ciervos. **Revista Caudal** Anuario septiembre 18, 16-18.
- COTA-RIVAS, M. y VALLEJO-CÓRDOBA, B.V. (1997). Capillary electrophoresis for meat

species differentiation. **Journal of Capillary Electrophoresis** 4, 195-199.

COZZI, M.C., STRILLACCI, M.G., VALIATI, P., BIGHIGNOLI, B., CANCEDDA, M. y ZANOTTI, M. (2004). Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. **Genetic Selection Evolution** 36, 663-672.

COZZOLINO, D. (2002). Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. **Agrociencia** 6, 25-32.

CRONIN, M.A. (1992). Analysis of total mitochondrial DNA (mtDNA) with restriction enzymes to identify mtDNA genotypes among North American cervids: moose, caribou, elk, white-tailed deer and mule deer. **Journal of Mammology** 73, 70-82.

CUTRUFELLI, M.E., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1992). Development of a deer rapid identification field test (DRIFT) by modified agar-gel immunodiffusion. **Journal of AOAC International** 75, 74-76.

CUTRUFELLI, M.E., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1993). Development of a multispecies identification field-test by modified agar-gel immunodiffusion. **Journal of AOAC International** 76, 1022-1026.

DALMASSO, A., FONTANELLA, E., PIATTI, P., CIVERA, T., ROSATI, S. y BOTTERO, M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** 18, 81-87.

DALVIT, C., DE MARCHI, M. y CASSANDRO, M. (2007). Genetic traceability of livestock products: A review. **Meat Science** 77, 437-449.

DAWSON, R.J.G., GIBBS, H.L., HOBSON, K.A. y YEZERINAC, S.M. (1997). Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. **Heredity** 79, 506-514.

DEAN, M., WHITE, M.B., AMOS, J., GERRARD, B., STEWART, C., KHAW, K.T. y LEPPERT, M. (1990). Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. **Cell** 61, 863-870.

DE CARO, A. y VIEITES, C.M. (2001). Producción al aire libre de jabalíes cruza: costos, inversiones y sustentabilidad económica. **Archivos de Zootecnia** 50, 367-370.

DE LA FUENTE, M.A. y JUÁREZ, M. (2005). Authenticity assessment of dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 45, 563-585.

DE LA HABA, M.J., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D.C. y GUERRERO, J.E. (2007). Near infrared analysis as a first-line screening technique for identifying animal species in rendered animal by-product meals. **Journal of Near Infrared Spectroscopy** 15, 237-245.

DE LA ROZA-DELGADO, B., SOLDADO, A., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A., VICENTE, F., GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, D., DE LA HABA, M.J. y GUERRERO-GINEL, J.E. (2007). Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: A tool for food and feed safety. **Food chemistry** 105, 1164-1170.

- DE MARTINIS, E.C.P., DUVALL, R.E. y HITCHINS, A.D. (2007). Real-time PCR detection of 16S rRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection** 70, 1650-1655.
- DEMMELE, A., HUPFER, C., HAMPE, E.I., BUSCH, U. y ENGEL, K.H. (2008). Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus species*) in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4328-4332.
- DI PINTO, A., FORTE, V.T., CONVERSANO, M.C. y TANTILLO, G.M. (2005). Duplex polymerase chain reaction (D-PCR) for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. **Food Control** 16, 391-394.
- DING, H.B. y XU, R.J. (1999). Differentiation of beef and kangaroo meat by visible/near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Food Science** 64, 814-817.
- DOLNIK, V., LIU, S. y JOVANVICH, S. (2000). Capillary electrophoresis on microchip. **Electrophoresis** 21, 41-54.
- DOOLEY, J.J. y GARRETT, S.D. (2001). Development of meat speciation assays using the Agilent 2100 bioanalyzer. Agilent Technologies application note no 5988-4069EN.
- DOOLEY, J.J., GARRETT, S.D. y BROWN, H.M. (2003). Development of molecular markers suitable for the detection of olive oil adulteration with hazelnut oil. Final report for Food Standards Agency project no Q01060.
- DOOLEY, J.J., PAINE, K.E., GARRETT, S.D. y BROWN, H.M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. **Meat Science** 68, 431-438.
- DOOLEY, J.J., SAGE, H.D., CLARKE, M.L., BROWN, H.H. y GARRETT, S.D. (2005a). Fish species identification using PCR-RFLP analysis and *lab-on-a-chip* capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an interlaboratory study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 3348-3357.
- DOOLEY, J.J., GARRETT, S.D. y BROWN, H.H. (2005b). Improved fish species identification by use of *lab-on-a-chip* technology. **Food Control** 16, 601-607.
- DOWNEY, G., McELHINNEY, J. y FEARN, T. (2000). Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near-infrared and visible ranges. **Applied Spectroscopy** 54, 894-899.
- EDWARDS, C., BRADLEY, D.G. y MACHUGH, D.E. (2000). A panel of Y-specific microsatellite markers suitable for studies of genetic differentiation in cattle and related species. **Animal Genetics** 31, 127-130.
- EDWARDS, S.G., O'CALLAGHAN, J. y DOBSON, A.D.W. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research** 106, 1005-1025.
- ELEDATH, F.M. y HINES, H.C. (1996). Detection of nucleotide variations in the D-loop region of bovine mitochondrial DNA using polymerase chain reaction-based methodologies. **Animal Genetics** 27, 333-336.

- ELLIS, D.I., BROADHURST, D., CLARKE, S.J. y GOODACRE, R. (2005). Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. **Analyst** 130, 1648-1654.
- ESPINOZA, E.O., KIRMS, M.A. y FILIPEK, M.S. (1996). Identification and quantitation of source from haemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. **Journal of Forensic Sciences** 41, 804-811.
- EUGSTER, A., RUF, J., RENTSCH, J., HUBNER, P. y KOPPEL, R. (2008). Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. **European Food Research and Technology** 227, 17-20.
- FAESTE, C.K. y PLASSEN, C. (2008). Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. **Journal of Immunological Methods** 329, 45-55.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 1144-1150.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, I., PAVÓN, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Journal of AOAC International** 90, 179-186.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science** 76, 234-240.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop. **Meat Science** 76, 644-652.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes. **Meat Science** 78, 314-322.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat Science** 79, 289-298.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y

- MARTÍN, R. (2008). Real-Time PCR for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Journal of AOAC International** 91, 103-111.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., DOOLEY, J., GARRET, S., BROWN, H.M., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2009). Application of PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game and domestic meats. **Journal of the Science and Agriculture** (manuscript in press).
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2009). A LigthCycler TaqMan® PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **Food Science and Technology International** (manuscript under revision).
- FAN, B., HAN, J.L., CHEN, S.L., MBURU, D.N., HANOTTE, O., CHEN, Q.K., ZHAO, S.H. y LI, K. (2008). Individual-breed assignments in caprine populations using microsatellite DNA analysis. **Small Ruminant Research** 75, 154-161.
- FEI, S., OKAYAMA, T., YAMANOUE, M., NISHIKAWA, I., MANNEN, H. y TSUJI, S. (1996). Species identification of meats and meat products by PCR. **Animal Science and Technology** 67, 900-905.
- FELIGINI, M., ALIM, N., BONIZZI, I., ENNE, G. y ALEANDRI, R. (2007). Detection of cow milk in water buffalo cheese by SYBR Green real-time PCR: sensitivity test on governing liquid samples. **Pakistan Journal of Nutrition** 6, 94-98.
- FERNÁNDEZ, A., FABUEL, E., ALVES, E., RODRÍGUEZ, C., SILIÓ, L. y ÓVILO, C. (2004). DNA tests based on coat colour genes for authentication of the raw material of meat products from Iberian pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 84, 1855-1860.
- FLETCHER, T.J. (1997). European perspectives on the public health risks posed by farmed game mammals. **Scientific and Technical Review** 16, 571-578.
- FORREST, A.R.R. y CARNEGIE, P.R. (1994). Identification of gourmet using FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). **BioTechniques** 17, 24-26.
- FREESE, L., SCHOLDBERG, T.A., BURTON, D.D., NORDEN, T.D., SHOKERE, L.A. y JENKINS, G.R. (2007). Evaluating homogeneity of LL601 rice in commercial lots using quantitative real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 6060-6066.
- FREZZA, D., FAVARO, M., VACCARI, G., VON-HOLST, C., GIAMBRA, V., ANKLAM, E., BOVE, D., BATTAGLIA, P.A., AGRIMI, U., BRAMBILLA, G., AJMONE-MARSAN, P. y TARTAGLIA, M. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. **Journal of Food Protection** 66, 103-109.
- FREZZA, D., GIAMBRA, V., CHEGDANI, F., FONTANA, C., MACCABIANI, G., LOSIO, N., FAGGIONATO, E., CHIAPPINI, B., VACCARI, G., VON HOLST, C., LANNI, L., SACCARES, S. y

- AJMONE-MARSAN, P. (2008). Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 9, 18-23.
- FUJITA, K. y SILVER, J. (1994). Single-strand conformational polymorphism. **PCR Methods and Applications** 4, 137-140.
- FUMIÈRE, O., DUBOIS, M., BAETEN, V., HOLST, C.V. y BERBEN, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 385, 1045-1054.
- GAO, H.W., LIANG, C.Z., ZHANG, Y.B. y ZHU, L.H. (2004) Polymerase chain reaction method to detect canis materials by amplification of species-specific DNA fragment. **Journal of AOAC International** 87, 1195-1199.
- GARRIDO-VARO, A., PÉREZ-MARÍN, M.D., GUERRERO, J.E., GÓMEZ-CABRERA, A., DE LA HABA, M.J., BAUTISTA, J., SOLDADO, A., VICENTE, F., MARTÍNEZ, A., DE LA ROZA-DELGADO, B. y TERMES, S. (2005). Near infrared spectroscopy for enforcement of European legislation concerning the use of animal by-products in animal feeds. **Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement** 9, 3-9.
- GIOVANNACCI, I., GUIZARD, C., CARLIER, M., DUVAL, V., MARTIN, J.L. y DEMEULEMESTER, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. **International Journal of Food Science and Technology** 39, 863-867.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B.M. y BHASKAR, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. **Meat Science** 66, 551-556.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., SHIVAKUMAR, B.M., ANAND, M., PATEL, M. y SHARMA, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science** 70, 107-112.
- GIUFFRÀ, E., KIJAS, J.M.H., AMARGER, V., CARLBORG, Ö., JEON, J.T. y ANDERSSON, L. (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics** 154, 1785-1791.
- GLAVAC, D. y DEAN, M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Human Mutation** 2, 404-414.
- GONGORA, J., PELTONIEMI, O.A.T., TAMMEN, I., RAADSMA, H. y MORAN, C. (2003). Analyses of possible domestic pig contribution in two populations of finnish farmed wild boar. **Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science** 53, 161-165.
- GONZÁLEZ, A., GUILLAMÓN, J.M., MAS, A. y POBLET, M. (2006). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 108, 141-146.
- GOTTWALD, E., MÜLLER, O. y POLTEN, A. (2001). Semiquantitative reverse transcription-

- polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Electrophoresis** 22, 4016-4022.
- GRADY, J.O., SEDANO-BALBAS, S., MAHER, M., SMITH, T. y BARRY, T. (2008). Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology** 25, 75-84.
- GRANADOS, J.E., CABRERA, M.C., GARCÍA, J. y FANDOS, P. (2001a). El ciervo común (*Cervus elaphus* Linneo, 1758) en el Parque Natural de la Sierra de Baza (Granada). **Galemys** 13, 27-37.
- GRANADOS, J.E., PÉREZ, J.M., MÁRQUEZ, F.J., SERRANO, E., SORIGUER, R.C. y FANDOS, P. (2001b). La cabra montés (*Capra pyrenaica*, Schinz 1838). **Galemys** 13, 3-37.
- GROVES, P. y SHIELDS, E.F. (1996). Phylogenetics of the *Caprinae* based on cytochrome b sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 5, 467-476.
- GUO, J., DU, L.X., MA, Y.H., GUAN, W.J., LI, H.B., ZHAO, Q.J., LI, X. y RAO, S.Q. (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics** 36, 331-336.
- HA, J.C., JUNG, W.T., NAM, Y.S. y MOON, T.W. (2006). PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. **Journal of Food Protection** 69, 2241-2247.
- HABERFELD, A., CAHANER, A., YOFFE, O., PLOTSKY, Y. y HILLEL, J. (1991). DNA fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. **Animal Genetics** 22, 299-305.
- HANSEN-CATTA, P.H. y col. (2002). Larousse de la caza. [Adaptación y prólogo de Juan Delibes]. Spes editorial (Ed.), Barcelona, España.
- HEIN, I., MACH, R.L., FARNLEITNER, A.H. y WAGNER, M. (2003). Application of single strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis for *fla* sequence typing of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Microbiological Methods** 52, 305-313.
- HERMAN, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research** 68, 429-436.
- HERNÁNDEZ, P.E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., ANGUITA, G., HAZA, A.I., GONZÁLEZ, I. y SANZ, B. (1994). Antibody-based analytical methods for meat species determination and detecting adulteration of milk. **Food and Agricultural Immunology** 6, 95-104.
- HERNÁNDEZ, M., ESTEVE, T., PRAT, S. y PLA, M. (2004). Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] green I, amplifluorTM and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **Journal of Cereal Science** 39, 99-107.
- HIENDLEDER, S., MAINZ, K., PLANTE, Y. y LEWALSKI, H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: No evidence for contributions from urial and argali sheep. **Journal of Heredity** 89, 113-120.
- HIENDLEDER, S., KAUPPE, B., WASMUTH, R. y JANKE, A. (2002). Molecular analysis of wild

and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. **Proceedings of the Royal Society London B** 269, 893-904.

HIERRO, N., GONZÁLEZ, A., MAS, A. y GUILLAMÓN, J.M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology** 97, 792-801.

HIRD, H., GOODIER, R. y HILL, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. **Meat Science** 65, 1117-1123.

HIRD, H., CHISHOLM, J. y BROWN, J. (2005). The detection of commercial duck species in food using a single probe-multiple species-specific primer real-time PCR assay. **European Food Research and Technology** 221, 559-563.

HIRD, H., CHISHOLM, J., SÁNCHEZ, A., HERNÁNDEZ, M., GOODIER, R., SCHNEEDE, K., BOLTZ, C. y POPPING, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. **Food Additives and Contaminants** 23, 645-650.

HOFFMAN, L.C. y WIKLUND, E. (2006). Game and venison-meat for the modern consumer. **Meat Science** 74, 197-208.

HOFMANN, K. (1997). Detection of meat of different animal species in meat products. **Fleischwirtschaft** 77, 151-154.

HOOFFAR, J., MALORNY, B., ABDULMAWJOOD, A., COOK, N., WAGNER, M. y FACH, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology** 42, 1863-1868.

HOPWOOD, A.J., FAIRBROTHER, K.S., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. **Meat Science** 53, 227-231.

HSIEH, Y.H.P., WOODWARD, B.B. y HO, S.H. (1995). Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. **Journal of Food Protection** 58, 555-559.

HSIEH, Y.H.P., SHEU, S.C. y BRIDGMAN, R.C. (1998). Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. **Journal of Food Protection** 61, 476-481.

HSIEH, H.M., CHIANG, H.L., TSAI, L.C., LAI, S.Y., HUANG, N.E., LINACRE, A. y LEE, J.C.I. (2001). Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. **Forensic Science International** 122, 7-18.

HUANG, H.B., YU, H.Y., XU, H.R. y YING, Y.B. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. **Journal of Food Engineering** 87, 303-313.

HUANG, J., GROTZER, M.A., WATANABE, T., HEWER, E., PIETSCH, T., RUTKOWSKI, S. y OHGAKI, H. (2008). Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene in medulloblastomas. **Clinical Cancer Research** 14, 4053-4058.

- HURLEY, I.P., COLEMAN, R.C., IRELAND, H.E. y WILLIAMS, J.H.H. (2004). Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. **Journal of Dairy Science** 87, 543-549.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- JANSSEN, F.W., HÄGELE, G.H., BUNTJER, J.B. y LENSTRA, J.A. (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 21, 115-120.
- JEMMI, T. y SCHLOSSER, H. (1991). Animal species determination in heat-treated meat from domestic and wild ruminants using isoelectric-focusing. **Fleischwirtschaft** 71, 1191-1195.
- JEMMI, T. y SCHLOSSER, H. (1993). Species identification in marinated and heat-treated meat using isoelectricfocusing. **Fleischwirtschaft** 73, 600-602.
- JONES, S.J. y PATTERSON, R.L.S. (1986). A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 37, 767-775.
- JONKER, K.M., TILBURG, J.J.H.C., HÄGELE, G.H. y DE BOER, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. **Food Additives and Contaminants** 25, 527-533.
- KANGETHE, E.K., JONES, S.J. y PATTERSON, R.L. (1982). Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. **Meat Science** 7, 229-240.
- KANGETHE, E.K., GATHUMA, J.M. y LINDQVIST, K.J. (1986). Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 37,157-164.
- KARLSSON, A.O. y HOLMLUND, G. (2007). Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. **Forensic Science International** 173, 16-20.
- KERJE, S., LIND, J., SCHUTZ, K., JENSEN, P. y ANDERSSON, L. (2003). Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. **Animal Genetics** 34, 241-248.
- KESMEN, Z., SAHIN, F. y YETIM, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. **Meat Science** 77, 649-653.
- KIJAS, J.H.M., WALES, R., TÖRNSTEN, A., CHARDON, P., MOLLET, M. y ANDERSSON, L. (1998). Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. **Genetics** 150, 1177-1185.
- KIJAS, J.M.H. y ANDERSSON, L. (2001). A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. **Journal of Molecular Evolution** 52, 302-308.

- KIM, M.S., JEONG, E.G., YOO, N.J. y LEE, S.H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. **British Journal of Cancer** 98, 1533-1535.
- KIMURA, B., KAWASAKI, S., NAKANO, H. y FUJII, T. (2001). Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmospherepackaged fish. **Applied and Environmental Microbiology** 67, 206-216.
- KING, N.L. (1984). Species identification of cooked meats by enzyme-staining of isoelectricfocusing gels. **Meat Science** 11, 59-72.
- KITANO, T., UMETSU, K., TIAN, W. y OSAWA, M. (2007). Two universal primer sets for species identification among vertebrates. **International Journal of Legal Medicine** 121, 423-427.
- KLUNGLAND, H., VAGE, D.I., GÓMEZ-RAYA, L., ADALSTEINSSON, S. y LIEN, S. (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. **Mammalian Genome** 6, 636-639.
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. y WILSON, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy Sciences** 86, 6196-6200.
- KOCHZIUS, M., NÖLTE, M., WEBER, H., SILKENBEUMER, N., HJÖERLEIFSDOTTIR, S., HREGGVIDSSON, G.O., MARTEINSSON, V., KAPPEL, K., PLANES, S., TINTI, F., MAGOULAS, A., GARCÍA VÁZQUEZ, E., TURAN, C., HERVET, C., CAMPO FALGUERAS, D., ANTONIOU, A., LANDI, M. y BLOHM, D. (2008). DNA microarrays for identifying fishes. **Marine Biotechnology** 10, 207-217.
- KOH, M.C., LIM, C.H., CHUA, S.B., CHEW, S.T. y PHANG, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. **Meat Science** 48, 275-285.
- KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495-497.
- KONISHO, K., MINAMI, M., MATSUSHIMA, K. y NEMOTO, K. (2005). Phylogenetic relationship and species identification by RAPD analysis in genus *Capsicum*. **Horticultural Research** 4, 259-264.
- KONJEVIC, D. (2007). Deer farming for venison production. **Meso** 9, 52-56.
- KONSTANTINOS, K.V., PANAGIOTIS, P., ANTONIOS, V.T., AGELOS, P. y ARGIRIS, N.V. (2008). PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. **Molecular Biotechnology** 38, 155-163.
- KOPPEL, R., RUF, J., ZIMMERLI, F. y BREITENMOSER, A. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. **European Food Research and Technology** 227, 1199-1203.

- KOTOWICZ, M., ADAMCZYK, E. y BANIA, J. (2007). Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 14, 215-218.
- KOUTSOGIANNOULI, E.A., MOUTOU, K.A., SARAFIDOU, T., STAMATIS, C. y MAMURIS, Z. (2008). Detection of hybrids between wild boars (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa f. domestica*) in Greece, using the PCR-RFLP method on melanocortin-1 receptor (*MC1R*) mutations. **Mammalian Biology** doi:10.1016/j.mambio.2008.08.001.
- KOVEZA, O.V., KOKAEVA, Z.G., KONOVALOV, F.A. y GOSTIMSKY, S.A. (2005). Identification and mapping of polymorphic RAPD markers of pea (*Pisum sativum* L.) genome. **Genetika** 41, 341-348.
- KRASCSENICSOVA, K., PIKNOVA, L., KACLIKOVA, E. y KUCHTA, T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology** 46, 483-487.
- KRCMAR, P. y RENCOVA, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. **Journal of Food Protection** 68, 1217-1221.
- KRÍZOVÁ, J., SPANOVÁ, A. y RITTICH, B. (2008). RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. **Folia Microbiologica** 53, 99-104.
- KRKOSKA, L., NEBOLA, M., STEINHAUSEROVÁ, I., OBROSKÁ, I. y ERNST, M. (2003). Using the PCR-RFLP method. **Fleischwirtschaft International** 2, 39-42.
- KULMYRZAEV, A.A., KAROUI, R., DE BAERDEMAEKER, J. y DUFOUR, E. (2007). Infrared and fluorescence spectroscopic techniques for the determination of nutritional constituents in foods. **International Journal of Food Properties** 10, 299-320.
- KUSAMA, T., NOMUTA, T. y KADOWAKI, K. (2004). Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal origin. **Journal of Food Protection** 67, 1289-1292.
- KVASNICKA, F. (2005). Capillary electrophoresis in food authenticity. **Journal of Separation Science** 28, 813-825.
- LAHIFF, S., GLENNON, M., O'BRIEN, L., LYNG, J., SMITH, T., MAHER, M. y SHILTON, N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). **Molecular and Cellular Probes** 15, 27-35.
- LAHIFF, S., GLENNON, M., LYNG, J., SMITH, T., SHILTON, N. y MAHER, M. (2002). Real time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. **Journal of Food Protection** 65, 1158-1165.
- LAI, S.J., LIU, Y.P., LIU, Y.X., LI, X.W. y YAO, Y.G. (2006). Genetic diversity and origin Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38, 146-154.
- LANZILAO, I., BURGALASSI, F., FANCELLI, S., SETTIMELLI, M. y FANI, R. (2005). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from

- species of dairy interest. **Journal of AOAC International** 88, 128-135.
- LAUBE, I., ZAGON, J. y BROLL, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology** 42, 336-341.
- LEE, H.H. y YAGER, P. (2007). Microfluidic *lab-on-a-chip* for microbial identification on a DNA microarray. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 12, 634-639.
- LENSTRA, J., BUNTJER, J. y JANSSEN, W. (2001). On the origin of meat-DNA techniques for species identification in meat products. **Veterinary Sciences Tomorrow** 2, 1-15.
- LEVIN, R.E. (2004). The application of real time PCR to food and agricultural systems. **Food Biotechnology** 18, 97-133.
- LI, B., BAI, S.Y., XU, Y.C., ZHANG, W. y MA, J.Z. (2006). Identification of sika deer and red deer using partial cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. **Journal of Forestry Research** 17, 160-162.
- LI, Y.C., LEE, C., CHANG, W.S., LI, S.Y. y LIN, C.C. (2002). Isolation and identification of a novel satellite DNA family highly conserved in several *Cervidae* species. **Chromosoma** 111, 176-183.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2000a). DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science and Technology** 11, 67-77.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2000b). Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 4463-4468.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. **Meat Science** 61, 163-168.
- LONJA AGROPECUARIA DE CIUDAD REAL. Cámara de comercio e industria de Ciudad Real. Disponible on line en: www.camaracr.org.
- LÓPEZ, I. y PARDO, M.A. (2005). Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 4554-4560.
- LÓPEZ-ANDREO, M., LUGO, L., GARRIDO-PERTIERRA, A., PRIETO, M.I. y PUYET, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry** 339, 73-82.
- LÓPEZ-ANDREO, M., GARRIDO-PERTIERRA, A. y PUYET, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 7973-7978.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., RODRÍGUEZ, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN R. (2005a). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. **International Dairy Journal** 15, 1122-1129.

- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2005b). Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. **Journal of Dairy Science** 88, 3115-3120.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. **Food Control** 18, 1466-1473.
- LOPPARELLI, R.M., CARDAZZO, B., BALZAN, S., GIACCONE, V. y NOVELLI, E.J. (2007). Real-time Taqman polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 3429-3434.
- LUIKART, G., BIJU-DUVAL, M.P., ERTUGRUL, O., ZAGDSUREN, Y., MAUDET, C. y TABERLET, P. (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics** 30, 431-438.
- LUND, M. y MADSEN, M. (2006). Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. **Molecular and Cellular Probes** 20, 92-99.
- LUYKX, D.M.A.M. y VAN RUTH S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry** 107, 897-911.
- MACEDO-SILVA, A., BARBOSA, S.F.C., ALKMIN, M.G.A., VAZ, A.J., SHIMOKOMAKI, M. y TENUTA-FILHO, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. **Meat Science** 56, 189-192.
- MAEDE, D. (2006). A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences. **European and Food Research Technology** 224, 209-217.
- MAEDE, D., REITING, R., STRAUCH, E., KETTERITZSCH, K. y WICKE, A. (2008). A real-time PCR for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an universal internal amplification control system. **Journal of Consumer Protection and Food Safety** 3, 141-151.
- MAFRA, I., FERREIRA, I.M.P.L.V.O. y OLIVEIRA, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology** 227, 649-665.
- MALORNY, B., LOFSTROM, C., WAGNER, M., KRAMER, N. y HOORFAR, J. (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 1299-1304.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2004). Anuario de Estadística Agroalimentaria. Efectivos y Producciones Ganaderas. Caza y Pesca. Capítulo 29. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, España.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2005). Libro de la Alimentación

española. Panel de consumo alimentario. Alimentación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, España.

MARCHIORI, A.F. y DE FELÍCIO, P.E. (2003). Quality of wild boar meat and commercial pork. **Scientia Agricola** 60, 1-5.

MARKLUND, S., CHAUDHARY, R., MARKLUND, L., SANDBERG, K. y ANDERSSON, L. (1995). Extensive mtDNA diversity in horses revealed by PCR-SSCP analysis. **Animal Genetics** 26, 193-196.

MARKLUND, L., MOLLER, M.J., SANDBERG, K. y ANDERSSON, L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. **Mammalian Genome** 7, 895-899.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988a). Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble-proteins. **Journal of Food Protection** 51, 790-794.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988b). Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble-proteins. **Meat Science** 22, 143-153.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988c). Detection of chicken meat in raw meat mixtures by sandwich enzyme immunoassay. **International Journal of Food Science and Technology** 23, 303-310.

MARTÍN, R., WARDALE, R.J., JONES, S.J., HERNÁNDEZ, P.E. y PATTERSON, R.L.S. (1989). Production and characterization of monoclonal-antibodies specific to chicken muscle soluble-proteins. **Meat Science** 25, 199-207.

MARTÍNEZ, I. e YMAN, I.M. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. **Food Research International** 31, 459-466.

MARTÍNEZ, I. y DANÍELSDÓTTIR, A.K. (2000). Identification of marine mammal species in food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80, 527-533.

MASCINI, M., DEL CARLO, M., MINUNNI, M., CHEN, B.N. y COMPAGNONE, D. (2005). Identification of mammalian species using genosensors. **Bioelectrochemistry** 67, 163-169.

MATEOS-QUESADA, P. (2005). Corzo – *Capreolus capreolus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L.M., Salvador, A. (Eds.), Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España. Disponible on line en: <http://www.vertebradosibericos.org>.

MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., NAKAI, H., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHINMURA, Y. (1998). Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. **Meat Science** 49, 379-385.

MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHIMMURA, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and

meat products by PCR assay. **Meat Science** 51, 143-148.

MAUDET, C. y TABERLET, P. (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene polymorphism. **Journal of Dairy Science** 85, 707-715.

MAYER, H.K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal** 15, 595-604.

McCORMICK, R.J., MOORE, T.D., FIELD, R.A. y HEPWORTH, W.G. (1988). Identification of deer meat in cooked products. **Wildlife Society Bulletin** 16, 433-436.

McCORMICK, R.J., COLLINS, D.A., FIELD, R.A. y MOORE, T.D. (1992). Identification of meat from game and domestic species. **Journal of Food Science** 57, 516-520.

MCDOWELL, D.G., PARKES, H.C., ARCHARD, C.L. y BIRCH, L. (2001). Evaluation of LabChip technology for GMO analysis in food. **Food Control** 12, 535-540.

MCELHINNEY, J., DOWNEY, G. y O'DONNELL, C. (1999). Quantitation of lamb content in mixtures with raw minced beef using visible, near and mid-infrared spectroscopy. **Journal of Animal Science** 64, 587-591.

MEGENS, H.J., CROOIJMANS, R.P.M.A., SANCRISTOBAL, M.S., HUI, X., LI, N. y GROENEN, M.A.M. (2008). Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. **Genetics Selection Evolution** 40, 103-128.

MENDOZA-ROMERO, L., VERKAAR, E.L.C., SAVELKOUL, P.H., CATSBURG, A., AARTS, H.J.M., BUNTJER, J.B. y LENSTRA, J.A. (2004). Real-time PCR detection of ruminant DNA. **Journal of Food Protection** 67, 550-554.

MEYER, R., CANDRIAN, U. y LÜTHY, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International** 77, 617-622.

MEYER, R., HÖFELEN, C., LÜTHY, J. y CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International** 78, 1542-1551.

MEYER, R. y CANDRIAN, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 29, 1-9.

MOATSOU, G. y ANIFANTAKIS, E. (2003). Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. **International Journal of Dairy Technology** 56, 133-138.

MOHINDRA, V., KHARE, P., LAL, K.K., PUNIA, P., SINGH, R.K., BARMAN, A.S. y LAKRA, W.S. (2007). Molecular discrimination of five Mahseer species from Indian peninsula using RAPD analysis. **Acta Zoologica Sinica** 53, 725-732.

MONTIEL-SOSA, J.F., RUIZ-PESINI, E., MONTOYA, J., ROCALÉS, P., LÓPEZ-PÉREZ, M.J. y PÉREZ-MARTOS, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in

- meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 2829-2832.
- MONTOWSKA, M. y POSPIECH, E. (2007). Species identification of meat by electrophoretic methods. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria** 6, 5-16.
- MOREIRAS y col. (2008). Tabla de composición de alimentos. Pirámide D.L. (Ed.), Madrid, España.
- MURRAY, B.W., MCCLYMONT, R.A. y STROBECK, C. (1995). Forensic identification of ungulate species using restriction fragment digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. **Journal of Forensic Science** 40, 943-951.
- MUSTORP, S., ENGDAHL-AXELSSON, C., SVENSSON, U. y HOLCK, A. (2008). Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. **European Food Research and Technology** 226, 771-778.
- MYERS, M.J., YANCY, H.F. y FARRELL, D.E. (2003). Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. **Journal of Food Protection** 66, 1085-1089.
- NACHAMKIN, I., PANARO, N.J., LI, M., UNG, H., YUEN, P.K., KRICKA, L.J. y WILDING, P. (2001). Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. **Journal of Clinical Microbiology** 39, 754-757.
- NAYA, Y., HORIUCHI, M., ISHIGURO, N. y SHINAGAWA, M. (2003). Bacteriological and genetic assessment of game meat from Japanese wild boars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 345-349.
- NECIDOVÁ, L., RENCOVÁ, E. y SVOBODA, I. (2002). Counter immunoelectrophoresis: a simple method for the detection of species-specific muscle proteins in heat-processed products. **Veterinari Medicina** 47, 143-147.
- NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T. y MILON, G. (2002). Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology** 40, 1666-1669.
- NÚÑEZ, N. y DE LA HABA, M.J. (2007). La tecnología NIRS como herramienta de innovación en el control de la calidad de las industrias cárnicas. **BoletínAICE** Diciembre, 33-36.
- O'GRADY, J., SEDANO-BALBAS, S., MAHER, M., SMITH, T. y BARRY, T. (2008). Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssr A* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology** 25, 75-84.
- OH, M.H., PARK, Y.S., PAEK, S.H., KIM, H.Y., JUNG, G.Y. y OH, S. (2008). A rapid and sensitive method for detecting foodborne pathogens by capillary electrophoresis-based single-strand conformation polymorphism. **Food control** 19, 1100-1104.
- OKUMURA, N., KOBAYASHI, E., SUZUKI, H., MOROZUMI, T., HAMASHIMA, N. y MITSUHASHI, T. (2000). Breed specific mutations in melanocortin receptor 1 (*MC1R*) and KIT

genes in pigs. **Animal Science Journal** 71, J222-J234.

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. y SEKIYA, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 2766-2770.

ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. y HAYASHI, K. (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics** 5, 874-879.

ORRÚ, L., NAPOLITANO, F., CATILLO, G. y MOIOLI, B. (2006) Meat molecular traceability: how to use the best set of microsatellites?. **Meat Science** 72, 312-317.

OTAVIANO, A.R., TONHATI, H., SENA, J.A.D. y CERÓN MUÑOZ, M.F. (2005). Kappacasein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Genetics and Molecular Biology** 28, 237-241.

PANARO, N.J., YUEN, P.K., SAKAZUME, T., FORTINA, P., KRICKA, L.J. y WILDING, P. (2000). Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Clinical Chemistry** 46, 1851-1853.

PARDIGOL, A., GUILLET, S. y POPPING, B. (2003). A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. **European Food Research and Technology** 216, 412-420.

PARISI, E. y AGUIARI, D. (1985). Methods of differentiating meats of different species of animals. In: Biochemical identification of meat species. R.L.S. Patterson (Ed.). Elsevier Applied Science Publication, London, 40-49.

PARK, J.K., SHIN, K.H., SHIN, S.C., CHUNG, K.Y. y CHUNG, E.R. (2007). Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources** 27, 209-215.

PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T. y MURBY, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meat. **Meat Science** 54, 369-376.

PASCAL, G. y MAHÉ, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. **Cellular and Molecular Biology** 47, 1329-1342.

PASCOAL, A., PRADO, M., CASTRO, J., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2004). Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. **European Food Research and Technology** 218, 306-312.

PASCOAL, A., PRADO, M., CALO, P., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2005). Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. **European Food Research**

and Technology 220, 444-450.

PEANO, C., BORDONI, R., GULLI, M., MEZZELANI, A., SAMSON, M.C., DE BELLIS, G. y MARMIROLI, N. (2005). Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified organisms in foods.

Analytical Biochemistry 346, 90-100.

PÉREZ, T., ALBORNOZ, J. y DOMÍNGUEZ, A. (2002). Phylogeography of chamois (*Rupicapra* spp.) inferred from microsatellites. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 25, 524-534.

PÉREZ-MARÍN, D., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO, J.E., MURRAY, I., PUIGDOMÈNECH, A., DARDENNE, P., BAETEN, V. y ZEGERS, J. (2004). Detection and quantification of mammalian meat and bone meals in compound feedingstuffs by NIR spectroscopy. In: Davies, A.M.C., Garrido, A. (Eds.), Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, 667-672.

PETIT, E., AULAGNIER, S., BON, R., DUBOIS, M. y CROUAUROY, B. (1997). Genetic structure of populations of the Mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*). **Journal of Mammalogy** 78, 459-467.

PFEFFER, P. (1967). Le mouflon de Corse (*Ovis ammon musimon* Schreber, 1782). Position systematique, ecologie et ethologie comparees. **Mammalia** 31, 1-262.

PFEIFFER, I., BURGER, J. y BRENIG, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. **Genetics** 5, 30.

PINHAL, D., GADIG, O.B.F., WASKO, A.P., OLIVEIRA, C., RON, E., FORESTI, F. y MARTINS, C. (2008). Discrimination of Shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. **Genetics and Molecular Biology** 31, 361-365.

PLATH, A., KRAUSE, I. y EINSPANIER, R. (1997). Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung** 205, 437-441.

POETSCH, M., SEEFELDT, S., MASCHKE, M. y LIGNITZ, E. (2001). Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer - possible employment in forensic applications. **Forensic Science International** 116, 1-8.

POPPING, B. (2002). The application of biotechnological methods in authenticity testing. **Journal of Biotechnology** 98, 107-112.

RAHMAN, A.A., DIXIT, V.P. y UMAPATHI, V. (2007). Characterization of thermostable antigens of different species of meat animals. **Indian Journal of Animal Sciences** 77, 840-844.

RAJAPAKSHA, W.R.A.K.J., THILAKARATNE, I.D.S.I.P., CHANDRASIRI, A.D.N. y NIROSHAN, T.D. (2002). Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meal of Sri Lanka. **Journal of Veterinary Medicine Series B** 49, 322-324.

RAMELLA, M.S., KROTH, M.A., TAGLIARI, C. y ARISI, A.C.M. (2005). Optimization of random

amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. **Ciencia e Tecnología de Alimentos Campinas** 25, 733-735.

RANDI, E., ALVES, P.C., CARRANZA, J., MILOSEVIC-ZLATANOVIC, S., SFOUGARIS, A. y MUCCI, N. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. **Molecular Ecology** 13, 3071-3083.

RAO, Q.C. y HSIEH, Y.H.P. (2008). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of bovine blood in heat-processed meat and feed. **Journal of Food Protection** 71, 1000-1006.

RASMUSSEN, R.S. y MORRISSEY, M.T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 7, 280-295.

RASTOGI, G., DHARNE, M.S., WALUJKAR, S., KUMAR, A., PATOLE, M.S. y SHOUCHE, Y.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. **Meat Science** 76, 666-674.

REA, S., CHIKUNI, K. y AVELLINI, P. (1996). Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig and wild boar meat samples. **Journal of Food Science** 3, 211-220.

REAL DECRETO 1095/1989, de 8 de septiembre de 1989, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se declaran las especies objeto de caza y pesca y se establecen normas para su protección. **Boletín Oficial del Estado** de 12 de septiembre de 1989.

REAL DECRETO 1118/1989, de 15 de septiembre de 1989, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se determinan las especies objeto de caza y pesca comercializables y se dictan normas al respecto. **Boletín Oficial del Estado** de 19 de septiembre de 1989.

REAL DECRETO 1334/1999, de 31 de julio de 1999, del Ministerio de la Presidencia, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. **Boletín Oficial del Estado** de 24 de agosto de 1999.

REAL DECRETO 2220/2004, de 26 de noviembre de 2004, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. **Boletín Oficial del Estado** de 27 de noviembre de 2004.

RECIO, I., RAMOS, M. y LÓPEZ-FANDINO, R. (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. **Electrophoresis** 22, 1489-1502.

REDDY, P.M. (2001). Development of antisera to testicular antigens for identification of species origin of meats using DID, IE, CIE and RIE techniques. **Journal of Food Science and Technology (India)** 38, 32-37.

REGLAMENTO 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea

la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L31, de 1 de febrero de 2002.

REGLAMENTO 852/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L139, de 30 de abril de 2004.

REGLAMENTO 853/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L139, de 30 de abril de 2004.

REHBEIN, H. y HORSTKOTTE, B. (2003). Determination of the composition of multi-species fishery products by PCR-based techniques. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Reykjavik-Iceland, L37, 190-192.

REHBEIN, H. (2005). Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. **European Food Research and Technology** 220, 625-632.

REJDUCH, B., RADKO, A., ZABEK, T., ROZYCKI, M. y WRZESKA, M. (2004). Analysis of variation for seven microsatellite DNA markers in a population of Polish Large White pigs and wild boars. **Cytogenetic and Genome Research** 106, 15-15.

RENCOVÁ, E., SVOBODA, I. y NECIDOVÁ, L. (2000). Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo and rat muscle specific proteins in heat processed products. **Veterinari Medicina** 45, 353-356.

RENON, P., BERNARDI, C., SCOCCA, S., CANTONI, C. y GRIDAVILLA, G. (2003). IEF (Isoelectricfocusing) and gaschromatography to identify wild ruminant species. **Industrie Alimentari** 42, 496-500.

RENSSEN, G., SMITH, W., RUZANTE, J., SAWYER, M., OSBURN, B. y CULLOR, J. (2005). Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminates in cattle feed. **Foodborne Pathogens and Disease** 2, 152-159.

RENSSEN, G.B., SMITH, W.L., JARAVATA, C.V., OSBURN, B. y CULLOR, J.S. (2006). Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay for the detection of prohibited meat and bone meal in cattle feed and feed ingredients. **Foodborne Pathogens and Disease** 3, 337-346.

RESTANI, P., BERETTA, B., FIOCCHI, A., BALLABIO, C. y GALLI, C.L. (2002). Cross-reactivity between mammalian proteins. **Annals of Allergy, Asthma, and Immunology** 89, 11-15.

RIDLEY, A.M., ALLEN, V.M., SHARMA, M., HARRIS, J.A. y NEWELL, D.G. (2008). Real-time PCR approach for detection of environmental sources of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 2492-2504.

RIPOLI, M.V., CORVA, P. y GIOVAMBATTISTA, G. (2006). Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. **Research in Veterinary Science**

80, 287-290.

RODRIGÁÑEZ, J., BARRAGÁN, C., ALVES, E., GORTÁZAR, C., TORO, M.A. y SILIÓ, L. (2008). Genetic diversity and allelic richness in Spanish wild and domestic pig population estimated from microsatellite markers. **Spanish Journal of Agricultural Research** 6, 107-115.

RODRÍGUEZ, D.J., PÉREZ, J.A. y DíEZ, C. (2004). Inspección, comercio y consumo de la carne de venado. **Linde y Ribera Caza** 14, 56-63.

RODRÍGUEZ, J.L. (1993): Guía de campo de los mamíferos terrestres de España (prólogo de Juan Delibes de Castro), Omega (Ed.), Barcelona, España.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., FERNÁNDEZ, A., LOBO, E., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2001). Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) in *foie gras* by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 2717-2721.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003). Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in *foie gras* by species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1524-1529.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003). Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in *foie gras* products. **Meat Science** 65, 1257-1263.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection** 67, 172-177.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004). Quantitation of mule duck in goose *foie gras* using TaqMan real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 1478-1483.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2005). TaqMan[®] real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. **Meat Science** 70, 113-120.

RONNING, S.B., VAITILINGOM, M., BERDAL, K.G. y HOLST-JENSEN, A. (2003). Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). **European Food Research and Technology** 216, 347-354.

ROSE, H. (2001). The future of the venison industry in the UK. **Journal of the British Deer Society** 11, 552-554.

ROSELL, C., FERNÁNDEZ-LLARIO, P. y HERRERO, J. (2001). El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). **Galemys** 13, 1-25.

- ROYO, L.J., PAJARES, G., ÁLVAREZ, I., FERNÁNDEZ, I. y GOYACHE, F. (2007). Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): A phylogeographic reassessment within the European framework. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 42, 47-61.
- ROYO, L.J., FERNÁNDEZ, I., AZOR, P.J., ALVÁREZ, I., PÉREZ-PARDAL, L. y GOYACHE, F. (2008). Technical note: A novel method for routine genotyping of horse coat color gene polymorphisms. **Journal of Animal Science** 86, 1291-1295.
- RUSSO, V., FONTANESI, L., SCOTTI, E., TAZZOLI, M., DALL'OLIO, S. y DAVOLI, R. (2007). Analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. **Italian Journal of Animal Science** 6, 257-272.
- SÁEZ, R., SANZ, Y. y TOLDRÁ, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. **Meat Science** 66, 659-665.
- SAINI, M., DAS, D.K., DHARA, A., SWARUP, D., YADAV, M.P. y GUPTA, P.K. (2007). Characterisation of peacock (*Pavo cristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. **British Poultry Science** 48, 162-166.
- SALVI, S., D'ORSO, F. y MORELLI, G. (2008). Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid TaqMan probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4320-4327.
- SANCRISTOBAL, M., CHEVALET, C., HALEY, C.S., JOOSTEN, R., HARLIZIUS, B., GROENEN, M., AMIGUES, Y., BOSCHER, M.Y., RUSSELL, G., LAW, A., DAVOLI, R., RUSSO, V., DESAUTES, C., ALDERSON, L., FIMLAND, E., BAGGA, M., DELGADO, J.V., VEGA-PLA, J.L., MARTÍNEZ, A.M., RAMOS, M., GLODEK, P., MEYER, J.N., GANDINI, G.C., MATASSINO, D., PLASTOW, G.S., SIGGENS, K.W., LAVAL, G., ARCHIBALD, A.L., MILAN, D., HAMMOND, K. y CARDELLINO, R. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. **Animal Genetics** 37, 189-198.
- SANTACLARA, F.J., ESPINEIRA, M. y VIEITES, J.M. (2007). Genetic identification of squids (Families *Ommastrephidae* and *Loliginidae*) by PCR-RFLP and FINS methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 9913-9920.
- SANTÍN, C. y CENTRICH, F. (1997). Identificación de especies animales en productos cárnicos por electroforesis. **Alimentaria** 282, 43-48.
- SAVAGE, A.W.J., RICHARDSON, R.I., JOLLEY, P.D., HARGIN, K.D. y STEWART, C.A. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - II: Gel Electrophoresis. **Meat Science** 40, 303-317.
- SAWYER, J., WOOD, C., SHANAHAN, D., GOUT, S. y McDOWELL, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. **Food Control** 14, 579-583.
- SBISÀ, E., TANZARIELLO, F., REYES, A., PESOLE, G. y SACCONI, C. (1997). Mammalian

mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene** 205, 125-140.

SCANDURA, M., IACOLINA, L., CRESTANELLO, B., PECCHIOLI, E., DI BENEDETTO, M.F., RUSSO, V., DAVOLI, R., APOLLONIO, M. y BERTORELLE, G. (2008). Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable?. **Molecular Ecology** 17, 1745-1762.

SCHÖENBRUCHER, H., ABDULMAWJOOD, A., GÖBEL, K.A. y BÜLTE, M. (2007). Detection of central nervous system tissues in meat products: Validation and standardization of a real-time PCR-based detection system. **Veterinary Microbiology** 123, 336-345.

SESEÑA, S., SÁNCHEZ, I. y PALOP, L. (2005). Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. **International Journal of Food Microbiology** 104, 325-335.

SEYBOLDT, C., JOHN, A., MUEFFLING, T.V., NOWAK, B. y WENZEL, S. (2003). Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for species-specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products. **Journal of Food Protection** 66, 644-651.

SEZAKI, K., ITOI, S. y WATABE, S. (2005). A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A-anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. **Fisheries Science** 71, 414-421.

SHARMA, D., SHARMA, A.K., DEB, S.M., SINGH, R.K. y BISHT, G.S. (2006). Identification of species specific marker(s) in ruminants using mini-/micro-satellite associated sequence amplification (MASA). **Indian Journal of Animal Sciences** 76, 248-251.

SHERIKAR, A.T., KARKARE, U.D., KHOT, J.B., JAYARAO, B.M. y BHILEGAONKAR, K.N. (1993). Studies on thermostable antigens, production of species-specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. **Meat Science** 33, 121-136.

SINGER, V.L., LAWLOR, T.E. y YOE, S. (1999). Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay. **Mutation Research** 439, 37-39.

SKARPEID, H.J., KVAAL, K. y HILDRUM, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. **Electrophoresis** 19, 3103-3109.

SKEWES, O. (2003). Carne de Jabalí. **Proveedores y Alimentos** 1, 19-22.

SLATTERY, W.J. y SINCLAIR, A.J. (1983). Differentiation of meat according to species by the electrophoretic separation of muscle lactate dehydrogenase and esterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle proteins. **Australian Veterinary Journal** 60, 47-51.

SMITH, D.M. (1995). Immunoassays in process control and speciation of meats. **Food Technology** 49, 116-119.

- SOTELO, C.G., CHAPELA, M.J., REY, M. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (2003). Development of an identification and quantitation system for cod (*Gadus morhua*) using TaqMan assay. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Reykjavik-Iceland, L39, 195-198.
- SPANIOLAS, S., MAY, S.T., BENNETT, M.J. y TUCKER, G.A. (2006). Authentication of coffee by means of PCR-RFLP analysis and *lab-on-a-chip* capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 7466-7470.
- SUN, Y.L. y LIN, C.S. (2003). Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1771-1776.
- SWÄGELE, F. (2005). Traceability from a European perspective. **Meat Science** 71, 164-173.
- SWART, K.S. y WILKS, C.R. (1983). An immunodiffusion method for the identification of the species of origin of meat samples. **Australian Veterinary Journal** 59, 21-22.
- TAKAHASHI, H., KIMURA, B., TANAKA, Y., MORI, M., YOKOI, A. y FUJII, T. (2008). Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. **Journal of food Protection** 71, 839-844.
- TAKEDA, K., ONISHI, A., ISHIDA, N., KAWAKAMI, K., KOMATSU, M. y INUMARU, S. (1995). SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. **Animal Genetics** 26, 321-326.
- TAKEUCHI, S., SUZUKI, H., YABUUCHI, M. y TAKAHASHI, S. (1996). A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. **Biochimica et Biophysica Acta** 1308, 164-168.
- TANABE, S., HASE, M., YANO, T., SATO, M., FUJIMURA, T. y AKIYAMA, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton and horseflesh in foods. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 71, 3131-3135.
- TARTAGLIA, M., SAULLE, E., PESTALOZZA, S., MORELLI, L., ANTONUCCI, G. y BATTAGLIA, P.A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. **Journal of Food Protection** 61, 513-518.
- TELETCHÉA, F., MAUDET, C. y HÄNNI, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. **Trends Biotechnology** 23, 359-366.
- TERMES, S., TAULER, R. y PUIGDOMÈNECH, A. (2004). Preliminary results in the determination of meat and bone meal in feedingstuffs. In: Davies, A.M.C., Garrido, A. (Eds.), Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, 659-662.
- TERZI, V., INFASCELLI, F., TUDISCO, R., RUSSO, G., STANCA, A.M. y FACCIOLO, P. (2004). Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technology** 37, 239-246.
- THEUNISSEN, P. y VALENTINE, D. (2003). Deer farming in New Zealand. Disponible on line en:

http://www.deer-library.com/artman/publish/article_99.shtml.

TINGEY, A. (2003). DNA and food analysis. **New Food** 6, 77-82.

TOBE, S.S. y LINACRE, A.M.T. (2008). A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. **Electrophoresis** 29, 340-347.

TOKARSKAYA, O.N., EFREMOVA, D.A., KAN, N.G., DANILKIN, A.A., SEMPERE, A., PETROSYAN, V.G. y RYSKOV, A.P. (2000). Variability of multilocus DNA markers in populations of Siberian (*Capreolus pygargus* Pall.) and European (*C. capreolus* L.) roe deer. **Genetika** 36, 1520-1530.

TOOROP, R.M., MURCH, S.J. y BALL, R.O. (1997). Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. **Food Research International** 30, 619-627.

TOYOTA, A., AKIYAMA, H., SUGIMURA, M., WATANABE, T., SAKATA, K., SHIRAMASA, Y., KITTA, K., HINO, A., ESAKA, M. y MAITANI, T. (2006). Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type real-time PCR system with a plasmid reference standard. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 70, 2965-2973.

TRAVIS, S.E. y KEIM, P. (1995). Differentiating individuals and populations of mule deer using DNA. **Journal of Wildlife Management** 59, 824-831.

ULBERTH, F. (2004). Analytical approaches for food authentication. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene** 95, 561-572.

UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. **PCR Methods and Applications** 4, 241-243.

VAGE, D.I., KLUNGLAND, H., LU, D. y CONE, R.D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mammalian Genome** 10, 39-43.

VAGE, D.I., FLEET, M.R., PONZ, R., OLSEN, R.T., MONTEAGUDO, L.V., TEJEDOR, M.T., ARRUGA, M.V., GAGLIARDI, R., POSTIGLIONI, A., NATTRASS, G.S. y KLUNGLAND, H. (2003). Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. **Pigment Cell Research** 16, 693-697.

VALLEJO, B., GONZÁLEZ, A.F., MAZORRA, M.A. y RODRÍGUEZ, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. **Journal of Separation Science** 28, 826-836.

VENKATACHALAPATHY, R.T., SHARMA, A., SUKLA, S. y HATTACHARYA, T.K. (2008). Cloning and characterization of DGAT1 gene of Riverine buffalo. **DNA Sequence** 19, 177-184.

VERNESI, C., CRESTANELLO, B., PECCHIOLI, E., TARTARI, D., CARAMELLI, D., HAUFFE, H. y BERTORELLE, G. (2003). The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite análisis. **Molecular Ecology** 12, 585-595.

- VERKAAR, E.L.C., NIJMAN, I.J., BOUTAGA, K. y LENSTRA, J.A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science** 60, 365-369.
- VIEITES, C.M., BASSO, C.P. y BARTOLONI, N. (2003). Wild boar (*Sus scrofa ferus*): productivity index in an experimental outdoor farm. **In Vet** 5, 91-95.
- WALKER, J.A., HUGHES, D.A., ANDERS, B.A., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2003). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. **Analytical Biochemistry** 316, 259-269.
- WALKER, J.A., HUGHES, D.A., HEDGES, D.J., ANDERS, B.A., LABORDE, M.E., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. **Genomics** 83, 518-527.
- WALTER, S., WINKERLMAYER, R., BAUER, F., HOFBAUER, P., SMULDERS, F.J.M. y PAULSEN, P. (2004). Composition of game meat from middle Europe. **Ernährung** 28, 110-117.
- WANG, Y., ZHU, W. y LEVY, D.E. (2006). Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. **Methods** 39, 356-362.
- WEDER, J.K.P. (2002). Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 35, 504-511.
- WELSH, J. y McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18, 7213-7218.
- WHITHAKER, R.G., SPENCER, T.L. y COPLAND, J.W. (1982). Enzyme linked immunosorbent assay for meat species testing. **Australian Veterinary Journal** 59, 125-125.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. y TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18, 6531-6535.
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 3741-3751.
- WOLF, C., RENTSCH, J. y HÜBNER, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1350-1355.
- WOOLFE, M. y PRIMROSE, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology** 22, 222-226.
- WU, X.B., LIU, H. y JIANG, Z.G. (2006). Identification primers for sika deer (*Cervus nippon*) from a sequence-characterised amplified region (SCAR). **New Zealand Journal of Zoology** 33, 65-71.
- YANG, Z., HAN, L., LIU, X. y LI, Q. (2008). Detecting and quantifying meat meal or meat and bone meal contamination in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectra. **Animal Feed Science and Technology** 147, 357-367.

- ZADE, N.N., MANDOKHOT, U.V., GOEL, M.C. y SAXENA, A.K. (2001). Species identification of meat by monoclonal antibody indirect enzyme linked immunosorbent assay. **Indian Journal of Animal Sciences** 71, 38-39.
- ZHANG, C.L., FOWLER, M.R., SCOTT, N.W., LAWSON, G. y SLATER, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks, and cheeses. **Food Control** 18, 1149-1158.
- ZHOU, H., HICKFORD, J.G.H. y FANG, Q. (2005). Polymorphism of the DQA2 gene in goats. **Journal of Animal Science** 83, 963-968.
- ZIMMERMANN, S., ZEHNER, R. y MEBS, D. (1998). Identification of animal species in meat samples by DNA-analysis. **Fleischwirtschaft** 78, 530-533.
- ZOMBORSZKY, Z., SZENTMIHÁLY, G., SARUDI, I., HORN, P. y SZABÓ, C.S. (1996). Nutrient composition of muscles in deer and boar. **Journal of Food Science** 61, 625-627.